

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

Receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference

(if desired) (12 characters maximum) DC/TP-BR95429

**Box No. I TITLE OF INVENTION**

RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FUNCTIONING PREFERABLY ON RNA MATRIX AND PROMOTER-DEPENDENT TRANSCRIPTION PROCESS WITH SAID RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE

**Box No. II APPLICANT**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

BIO MERIEUX  
69280 MARCY L'ETOILE  
FRANCE

This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant  all designated States  all designated States except the United States of America  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

**Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)**

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Valerie CHEYNET-SAUVION  
Les Aullieux  
42410 VERIN  
FRANCE

This person is:

applicant only

applicant and inventor

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

FRANCE

State (that is, country) of residence:

FRANCE

This person is applicant  all designated States  all designated States except the United States of America  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

**Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

agent

common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Jean-Claude TONNELLIER  
NONY & ASSOCIATES  
29, rue Cambacérès  
75008 PARIS  
FRANCE

Telephone No.

01/43-12-84-60

Facsimile No.

01/43-12-84-70

Teleprinter No.

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

## Continuation of Box No. III

## FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Nadège ARNAUD-BARBE  
15, rue Imbert Colomès  
69001 LYON  
FRANCE

This person is:

applicant only  
 applicant and inventor  
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:  
FRANCE

State (that is, country) of residence:  
FRANCE

This person is applicant for the purposes of:  all designated States  all designated States except the United States of America  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Guy ORIOL  
11, rue Jean-Baptiste Rivory  
42400 SAINT CHAMOND  
FRANCE

This person is:

applicant only  
 applicant and inventor  
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: FRANCE

State (that is, country) of residence: FRANCE

This person is applicant for the purposes of:  all designated States  all designated States except the United States of America  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

William McALLISTER  
59-L Reading Road  
Edison, NJ 08817  
U.S.A.

This person is:

applicant only  
 applicant and inventor  
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: U.S.A.

State (that is, country) of residence: U.S.A.

This person is applicant for the purposes of:  all designated States  all designated States except the United States of America  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Bernard MANDRAND  
21, rue de la Doua  
69100 VILLEURBANNE  
FRANCE

This person is:

applicant only  
 applicant and inventor  
 inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality: FRANCE

State (that is, country) of residence: FRANCE

This person is applicant for the purposes of:  all designated States  all designated States except the United States of America  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

## Continuation of Box No. III

## FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

*If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.*

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

François MALLET  
84, rue Anatole France  
69100 VILLEURBANNE  
FRANCE

This person is:

applicant only  
 applicant and inventor  
 inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(that is, country)* of nationality:  
FRANCE

State *(that is, country)* of residence:  
FRANCE

This person is applicant  all designated States  all designated States except the United States of America only  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:

applicant only  
 applicant and inventor  
 inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant  all designated States  all designated States except the United States of America only  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:

applicant only  
 applicant and inventor  
 inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant  all designated States  all designated States except the United States of America only  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:

applicant only  
 applicant and inventor  
 inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant  all designated States  all designated States except the United States of America only  the United States of America only  the States indicated in the Supplemental Box for the purposes of:

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

**Box No. V DESIGNATION OF STATES**

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (*mark the applicable check-boxes; at least one must be marked*):

**Regional Patent**

**AP** **ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT

**EA** **Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

**EP** **European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

**OA** **OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (*if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line*) .....

**National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):**

<input type="checkbox"/> AE United Arab Emirates .....	<input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia .....
<input checked="" type="checkbox"/> AL Albania .....	<input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho .....
<input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia .....	<input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania .....
<input checked="" type="checkbox"/> AT Austria .....	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg .....
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australia .....	<input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia .....
<input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan .....	<input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova .....
<input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina .....	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar .....
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados .....	<input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia .....
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria .....	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia .....
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil .....	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi .....
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus .....	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico .....
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada .....	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norway .....
<input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein .....	<input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand .....
<input checked="" type="checkbox"/> CN China .....	<input checked="" type="checkbox"/> PL Poland .....
<input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba .....	<input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal .....
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic .....	<input checked="" type="checkbox"/> RO Romania .....
<input checked="" type="checkbox"/> DE Germany .....	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation .....
<input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark .....	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan .....
<input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia .....	<input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden .....
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spain .....	<input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore .....
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finland .....	<input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia .....
<input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom .....	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia .....
<input type="checkbox"/> GD Grenada .....	<input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone .....
<input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia .....	<input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan .....
<input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana .....	<input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan .....
<input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia .....	<input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey .....
<input type="checkbox"/> HR Croatia .....	<input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago .....
<input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary .....	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine .....
<input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia .....	<input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda .....
<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel .....	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America .....
<input type="checkbox"/> IN India .....	<input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan .....
<input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland .....	<input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam .....
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan .....	<input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia .....
<input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya .....	<input type="checkbox"/> ZA South Africa .....
<input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan .....	<input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe .....
<input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea .....	
<input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea .....	
<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan .....	
<input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia .....	
<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....	

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

Guinea-Bissau .....

.....

**Precautionary Designation Statement:** In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except the designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (*Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.*)

**Box No. VI PRIORITY CLAIM** Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) April 4, 1997	97 04166	FRANCE		
item (2)				
item (3)				

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): \_\_\_\_\_

\* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

**Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

**Choice of International Searching Authority (ISA)**  
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA /

**Request to use results of earlier search: reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):**

Date (day/month/year)      Number      Country (or regional Office)  
December 16, 1997      FA 542006      EPO

**Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING**

This international application contains the following **number of sheets**:

request	:5
description (excluding sequence listing part)	:32
claims	:5
abstract	:1
drawings	:4
sequence listing part of description	:
<b>Total number of sheets</b>	<b>:47</b>

This international application is **accompanied by** the item(s) marked below:

1.  fee calculation sheet
2.  separate signed power of attorney
3.  copy of general power of attorney; reference number, if any:
4.  statement explaining lack of signature
5.  priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
6.  translation of international application into (language):
7.  separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
8.  nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
9.  other (specify): copy of International Search Report

**Figure of the drawings which should accompany the abstract:**

**Language of filing of the international application:**

**Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT**

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

Jean-Claude TONNELLIER  
(92-1241)

Paris, March 26, 1998

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /
6.  Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

2. Drawings:

received:

not received:

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00635

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C12N15/54 C12N9/12 C12Q1/68

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SOUSA R ET AL: "A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL 14 (18). 1995. 4609-4621. ISSN: 0261-4189, XP002049775 see the whole document ---	14-28
Y	WO 97 12033 A (UNIV EMORY) 3 April 1997 see the whole document ---	14-28
Y	W.T. MCALLISTER: "Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)" CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY RESEARCH, vol. 39, 1993, pages 385-391, XP002049776 see the whole document ---	14-28
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 August 1998

Date of mailing of the international search report

07/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hix, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00635

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	C.A. RASKIN ET AL.: "Substitution of a single bacteriophage T3 residue in Bacteriophage T7 RNA polymerase at position 748 results in a switch in promoter specificity." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 228, no. 2, 1992, pages 506-515, XP002049777 cited in the application see the whole document ---	14-28
X	C. CAZENAVE ET AL.: "RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase" PROC. NATL. ACD. SCI. USA, vol. 91, July 1994, pages 6972-6976, XP002049779 cited in the application see the whole document ---	1-13, 29-32
A	R. SOUSA: "Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases" TIBS, vol. 21, 1996, pages 186-190, XP004050909 cited in the application see the whole document ---	
A	S.J. STAHL ET AL.: "Nucleotide sequence of the cloned gene for Bacteriophage T7 RNA polymerase" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 148, no. 4, 5 June 1981, pages 481-485, XP002049780 cited in the application see the whole document ---	
X	EP 0 747 488 A (GEN PROBE INC) 11 December 1996 see the whole document ---	1-13, 29-32
X	WO 95 03426 A (BIO MERIEUX ; CLEUZIAT PHILIPPE (FR); GUILLOU BONNICI FRANCOISE (FR) 2 February 1995 see the whole document ---	1-13, 29-32
X	WO 90 06376 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 14 June 1990 see the whole document ---	1-13, 29-32
X	EP 0 659 881 A (BIO MERIEUX) 28 June 1995 see the whole document ---	1-13, 29-32
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00635

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B. VAN GEMEN ET AL.: "Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification" AIDS, vol. 7, no. 2, November 1993, pages s107-s110, XP002073546 see the whole document -----	1-13, 29-32

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/00635

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9712033	A 03-04-1997	AU 7200796 A		17-04-1997
		EP 0859833 A		26-08-1998
EP 0747488	A 11-12-1996	US 5710029 A		20-01-1998
		US 5705365 A		06-01-1998
		AU 5674896 A		30-12-1996
		WO 9640990 A		19-12-1996
WO 9503426	A 02-02-1995	FR 2708288 A		03-02-1995
		CA 2145533 A		02-02-1995
		EP 0662155 A		12-07-1995
		JP 8509382 T		08-10-1996
WO 9006376	A 14-06-1990	AT 137807 T		15-05-1996
		CA 2004574 A		05-06-1990
		DE 68926460 D		13-06-1996
		DE 68926460 T		12-09-1996
		EP 0446305 A		18-09-1991
		JP 4503302 T		18-06-1992
		US 5631129 A		20-05-1997
EP 0659881	A 28-06-1995	FR 2714062 A		23-06-1995
		CA 2138871 A		23-06-1995

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00635

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 C12N15/54 C12N9/12 C12Q1/68

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SOUSA R ET AL: "A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL 14 (18). 1995. 4609-4621. ISSN: 0261-4189, XP002049775 see the whole document ---	14-28
Y	WO 97 12033 A (UNIV EMORY) 3 April 1997 see the whole document ---	14-28
Y	W.T. MCALLISTER: "Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)" CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY RESEARCH, vol. 39, 1993, pages 385-391, XP002049776 see the whole document ---	14-28
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 August 1998

Date of mailing of the international search report

07/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hix, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00635

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	C.A. RASKIN ET AL.: "Substitution of a single bacteriophage T3 residue in Bacteriophage T7 RNA polymerase at position 748 results in a switch in promoter specificity." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 228, no. 2, 1992, pages 506-515, XP002049777 cited in the application see the whole document ---	14-28
X	C. CAZENAVE ET AL.: "RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase" PROC. NATL. ACD. SCI. USA, vol. 91, July 1994, pages 6972-6976, XP002049779 cited in the application see the whole document ---	1-13, 29-32
A	R. SOUSA: "Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases" TIBS, vol. 21, 1996, pages 186-190, XP004050909 cited in the application see the whole document ---	
A	S.J. STAHL ET AL.: "Nucleotide sequence of the cloned gene for Bacteriophage T7 RNA polymerase" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 148, no. 4, 5 June 1981, pages 481-485, XP002049780 cited in the application see the whole document ---	
X	EP 0 747 488 A (GEN PROBE INC) 11 December 1996 see the whole document ---	1-13, 29-32
X	WO 95 03426 A (BIO MERIEUX ; CLEUZIAT PHILIPPE (FR); GUILLOU BONNICI FRANCOISE (FR) 2 February 1995 see the whole document ---	1-13, 29-32
X	WO 90 06376 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 14 June 1990 see the whole document ---	1-13, 29-32
X	EP 0 659 881 A (BIO MERIEUX) 28 June 1995 see the whole document ---	1-13, 29-32
	-/-	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l	Jonal Application No
PCT/FR 98/00635	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>B. VAN GEMEN ET AL.: "Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification" AIDS, vol. 7, no. 2, November 1993, pages s107-s110, XP002073546 see the whole document</p> <p>-----</p>	1-13, 29-32

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Search Application No

PCT/FR 98/00635

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9712033	A 03-04-1997	AU 7200796	A	17-04-1997	
		EP 0859833	A	26-08-1998	
EP 0747488	A 11-12-1996	US 5710029	A	20-01-1998	
		US 5705365	A	06-01-1998	
		AU 5674896	A	30-12-1996	
		WO 9640990	A	19-12-1996	
WO 9503426	A 02-02-1995	FR 2708288	A	03-02-1995	
		CA 2145533	A	02-02-1995	
		EP 0662155	A	12-07-1995	
		JP 8509382	T	08-10-1996	
WO 9006376	A 14-06-1990	AT 137807	T	15-05-1996	
		CA 2004574	A	05-06-1990	
		DE 68926460	D	13-06-1996	
		DE 68926460	T	12-09-1996	
		EP 0446305	A	18-09-1991	
		JP 4503302	T	18-06-1992	
		US 5631129	A	20-05-1997	
EP 0659881	A 28-06-1995	FR 2714062	A	23-06-1995	
		CA 2138871	A	23-06-1995	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. Date Internationale No

PCT/FR 98/00635

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/54 C12N9/12 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SOUSA R ET AL: "A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL 14 (18). 1995. 4609-4621. ISSN: 0261-4189, XP002049775 voir le document en entier ---	14-28
Y	WO 97 12033 A (UNIV EMORY) 3 avril 1997 voir le document en entier ---	14-28
Y	W.T. MCALLISTER: "Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)" CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY RESEARCH, vol. 39, 1993, pages 385-391, XP002049776 voir le document en entier ---	14-28
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "\*&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 août 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/09/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hix, R

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Document International No

PCT/FR 98/00635

**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	C.A. RASKIN ET AL.: "Substitution of a single bacteriophage T3 residue in Bacteriophage T7 RNA polymerase at position 748 results in a switch in promoter specificity." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 228, no. 2, 1992, pages 506-515, XP002049777 cité dans la demande voir le document en entier ---	14-28
X	C. CAZENAVE ET AL.: "RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase" PROC. NATL. ACD. SCI. USA, vol. 91, juillet 1994, pages 6972-6976, XP002049779 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-13, 29-32
A	R. SOUSA: "Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases" TIBS, vol. 21, 1996, pages 186-190, XP004050909 cité dans la demande voir le document en entier ---	
A	S.J. STAHL ET AL.: "Nucleotide sequence of the cloned gene for Bacteriophage T7 RNA polymerase" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 148, no. 4, 5 juin 1981, pages 481-485, XP002049780 cité dans la demande voir le document en entier ---	
X	EP 0 747 488 A (GEN PROBE INC) 11 décembre 1996 voir le document en entier ---	1-13, 29-32
X	WO 95 03426 A (BIO MERIEUX ; CLEUZIAT PHILIPPE (FR); GUILLOU BONNICOISE (FR) 2 février 1995 voir le document en entier ---	1-13, 29-32
X	WO 90 06376 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 14 juin 1990 voir le document en entier ---	1-13, 29-32
X	EP 0 659 881 A (BIO MERIEUX) 28 juin 1995 voir le document en entier ---	1-13, 29-32
	-/-	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document Internationale No  
PCT/FR 98/00635

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	B. VAN GEMEN ET AL.: "Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification" AIDS, vol. 7, no. 2, novembre 1993, pages s107-s110, XP002073546 voir le document en entier -----	1-13, 29-32

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De de Internationale No

PCT/FR 98/00635

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
WO 9712033 A	03-04-1997	AU EP	7200796 A 0859833 A		17-04-1997 26-08-1998
EP 0747488 A	11-12-1996	US US AU WO	5710029 A 5705365 A 5674896 A 9640990 A		20-01-1998 06-01-1998 30-12-1996 19-12-1996
WO 9503426 A	02-02-1995	FR CA EP JP	2708288 A 2145533 A 0662155 A 8509382 T		03-02-1995 02-02-1995 12-07-1995 08-10-1996
WO 9006376 A	14-06-1990	AT CA DE DE EP JP US	137807 T 2004574 A 68926460 D 68926460 T 0446305 A 4503302 T 5631129 A		15-05-1996 05-06-1990 13-06-1996 12-09-1996 18-09-1991 18-06-1992 20-05-1997
EP 0659881 A	28-06-1995	FR CA	2714062 A 2138871 A		23-06-1995 23-06-1995

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION  
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 27 novembre 1998 (27.11.98)	Référence du dossier du déposant ou du mandataire DC/TP-BR95429
Demande internationale n° PCT/FR98/00635	Date de priorité (jour/mois/année) 04 avril 1997 (04.04.97)
Date du dépôt international (jour/mois/année) 27 mars 1998 (27.03.98)	
Déposant CHEYNET-SAUVION, Valérie etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

03 novembre 1998 (03.11.98)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

---

2. L'élection  a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télecopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Lazar Joseph Panakal no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	--

Translation

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

9/402131

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/00635	International filing date (day/month/year) 27 March 1998 (27.03.1998)	Priority date (day/month/year) 04 April 1997 (04.04.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/54		
Applicant BIO MERIEUX		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 03 November 1998 (03.11.1998)	Date of completion of this report 21 July 1999 (21.07.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR98/00635

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-33, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the claims, Nos. 1-27, 28 (in part), as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 28 (in part), 29-32, filed with the letter of 11 June 1999 (11.06.1999),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the drawings, sheets/fig 1/4-4/4, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_

the claims, Nos. \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 98/00635

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

The amendment to claim 30 introduced in the letter of 11.06.99 causes the subject matter of the application to go beyond the content of the application as filed. It therefore contravenes the requirements of PCT Article 34(2)(b). The amendment concerned is the following: "and is made up of DNA from said position ... does not coincide with said position". The description mentions only a template strand made up of DNA from position +1 to position +2, +3 or +4 (cf. p.9, l.14-16). Moreover, a template strand comprising negative positions (-1, -2 ...) is not envisaged by the description.

Consequently, the examination in section V below has been carried out on Claim 30 as initially filed.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 98/00635

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-29, 31, 32	YES
	Claims	30	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-13, 31-32	YES
	Claims	14-30	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-32	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: EP-A-0 659 881

D2: SOUSA R ET AL: "A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase", EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL 14 (18), 1995, 4609-4621

D3: W.T. MCALLISTER: "Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)", CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY RESEARCH, vol. 39, 1993, pages 385-391

D4: R. SOUSA: "Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases", TIBS, vol. 21, 1996, pages 186-190

1. Apart from D1, none of the documents cited in the international search report and considered relevant mentions the use of a second strand as defined in part (ii) of claim 1, in a similar method of amplification.

Document D1, which is considered to represent the most relevant prior art, discloses:

- (A), as prior art for the invention of D1 (p.6, 1.57-p.7, l.8), a method of amplification from which the subject of claim 1 differs in that it is produced without the action of a ligase.

- (B), as an invention (abstract and p.2, 1.41-42 and p.7, l.28-29), a promoter that can be used in a method for transcribing any DNA or RNA sequence. The structure of the modified promoter used in the method in claim 1 of the present application is different.

The subject of claim 1 is therefore novel (PCT Article 33(2)).

The problem that the present invention seeks to solve can therefore be considered as supplying an alternative method for amplification of an RNA sequence by the action of an RNA-dependent RNA polymerase.

The solution to this problem proposed in claim 1 of the present application is considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)), for the following reasons:

- a person skilled in the art would have had no reason to use method (A) cited above, without the action of a ligase
- he or she would not have been led to use, in method (B) cited above, a modified promoter with a different structure, comprising a second strand as defined in part (ii) of claim 1 and used in (A), without the action of a ligase.

Claims 2 to 13 are dependent on claim 1 and, as such, therefore also meet the requirements of the PCT concerning novelty and inventive step.

2. No RNA polymerase known in the prior art has all the features of that which is the subject of claim 14. The content of this claim is therefore novel (PCT Article 33(2)).

The objective problem therefore consists in supplying a new RNA-dependent RNA polymerase.

From D1, it is known that T7 RNA polymerase can transcribe, subordinate to a promoter, any DNA sequence without an associated protein factor. It is also known from the prior art that T7 RNA polymerase is capable of transcribing RNA.

A person skilled in the art would therefore have had ample incentive to modify such an enzyme with the aim of making it RNA-dependent. Moreover, the prior art would have provided him or her with the necessary elements (see below).

The content of claim 14 therefore does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

3. On the basis of the results obtained in D2 (abstract, introduction and p.4620, c.1, last complete paragraph) and the structure/function relationships presented in D4 (p.389 and 390) and D5, it seems obvious for a person skilled in the art to modify pattern B, which is responsible for association with the template strand, by mutation,

by introducing this mutation, for example, in position 631 or 639 (D4, p.389) or by replacing said pattern B with pattern B' of an RNA-dependent RNA polymerase (D5, p.186).

Dependent claims 15 to 24 therefore contain no feature which, in combination with those of one of the claims to which they refer, defines a subject which meets the requirements of the PCT concerning inventive step (PCT Article 33(3)).

4. In view of these arguments, the solution to the problem mentioned above necessarily involves the content of claims 25 to 28 which represent standard "tools" and a standard method for a person skilled in the art. Since RNA polymerase, the subject of claims 14 to 24, does not involve an inventive step, the same is true for claims 25 to 28 (PCT Article 33(3)).

5. The subject of claim 29 is novel (PCT Article 33(2)) because neither the action of RNA-dependent RNA polymerase subordinate to a T7 and SP6 RNA polymerase promoter, nor mutant RNA polymerases having such functions, were known in the prior art.

Nevertheless, since similar arguments to those in point 3 above apply to the content of claim 29, the latter does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

6. Method (B), cited in point 1 above and disclosed in document D1, mentions the use of RNA-dependent RNA polymerase (p.2, l.42) for transcription of a template (considered to be entirely made up of RNA)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 98/00635

subordinate to a promoter (p.7, l.28-29). The absence of auxiliary protein factors is implicit. This method therefore means that claim 30, as initially filed, is not novel (PCT Article 33(2)).

7. Since no RNA-dependent RNA polymerase activity, subordinate to a promoter and in the absence of an auxiliary protein factor, was either known from or made obvious by the prior art for a wild-type virus or phage RNA polymerase, the subject of claims 31 and 32 involves an inventive step (PCT Article 33(3)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR 98/00635
--

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not indicate the relevant prior art disclosed in documents D1 to D3 and does not cite these documents.

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The phrase "at least one of the properties..." used in claim 28 is vague and ambiguous, and gives rise to doubt as to the significance of the technical features to which it refers. For example, the selection of an RNA polymerase characterized only by its ability to synthesize in the absence of an associated protein factor is not consistent with the definition of the desired RNA polymerase (subject of claim 14, cited as a reference at the beginning of claim 28). The subject of this claim is therefore not clearly defined (PCT Article 6).
2. The description of the results obtained with a mutated T7 polymerase (p.27, l.24-25) is not consistent with figure 5 (pit 1: no transcript of 33 bases visible), which makes example 2 meaningless.

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

09/402131

PCT

REC'D 23 JUL 1999

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire DC/TP-BR29580	<b>POUR SUITE A DONNER</b>	voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)
Demande internationale n° PCT/FR98/00635	Date du dépôt international (jour/mois/année) 27/03/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 04/04/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/54		
Déposant BIO MERIEUX et al.		

<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 1 feuilles.</p>
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul>

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 03/11/1998	Date d'achèvement du présent rapport 21.07.99
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé Stricker, J-E N° de téléphone (+49-89) 2399 8395



# RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR98/00635

## I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initiallement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

**Description, pages:**

1-33 version initiale

### Revendications, N°:

1-27,  
28 (partie)

### **Dessins, feuilles:**

1/4-4/4 version initiale

## 2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description, pages :
- des revendications, n°s :
- des dessins, feuilles :

3.  Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

**voir feuille séparée**

#### 4 Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/00635

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-29, 31, 32 Non : Revendications 30
Activité inventive	Oui : Revendications 1-13, 31-32 Non : Revendications 14-30
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-32 Non : Revendications aucune

**2. Citations et explications**

**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**Section I**

La modification de la revendication 30 introduite avec la lettre du 11.06.99 conduit à étendre l'objet de la demande au-delà du contenu de la demande telle qu'elle a été déposée. Elle va par conséquent à l'encontre des dispositions de l'article 34(2) b) PCT. La modification concernée est la suivante: "et est constituée d'ADN à partir de ladite position ... ne coïncide pas avec ladite position". En effet, la description mentionne uniquement un brin matrice constitué d'ADN de la position +1 à la position +2, +3 ou +4 (cf. p.9, l.14-16). De plus, un brin matrice comportant des positions négatives (-1, -2 ...) n'est pas envisagé par la description.

Par conséquent, la revendication 30 telle qu'initialement déposée a été examinée à la section V ci-dessous.

**Section V**

Il est fait référence aux documents suivants :

D1 : EP-A-0 659 881

D2 : SOUSA R ET AL: "A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL 14 (18). 1995. 4609-4621.

D3 : W.T. MCALLISTER: "Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)" CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY RESEARCH, vol. 39, 1993, pages 385-391.

D4 : R. SOUSA: "Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases" TIBS, vol. 21, 1996, pages 186-190.

1. A part D1, aucun des documents cités dans le rapport de recherche internationale et considérés comme pertinents ne mentionne l'utilisation d'un second brin tel que définit en (ii) de la revendication 1, dans un procédé d'amplification similaire.

Le document D1, qui est considéré comme représentant l'état de la technique le plus pertinent, divulgue :

- (A) en tant qu'état antérieur de la technique pour l'invention de D1 (p.6 l. 57-p.7 l. 8), un procédé d'amplification dont l'objet de la revendication 1 diffère en ce qu'il est réalisé en l'absence d'une activité de ligase.
- (B) en tant qu'invention (résumé et p.2, l. 41-42 ainsi que p.7 l. 28-29), un promoteur utilisable dans un procédé de transcription d'une séquence quelconque d'ADN ou d'ARN. La structure du promoteur modifié utilisé dans le procédé de la revendication 1 de la présente demande est différente.

L'objet de la revendication 1 est donc nouveau (article 33(2) PCT).

Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme la fourniture d'un procédé alternatif d'amplification d'une séquence d'ARN à l'aide d'une activité ARN polymérase ARN-dépendante.

La solution de ce problème proposée dans la revendication 1 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive (Art. 33(3) PCT), et ce pour les raisons suivantes:

- l'homme du métier n'aurait eu aucune raison de mettre en oeuvre le procédé (A) cité ci-dessus, sans l'activité de ligase
- il n'aurait pas été incité à employer dans le procédé (B) cité ci-dessus, un promoteur modifié de structure différente, comprenant un second brin tel que définit en (ii) de la revendication 1 et utilisé dans (A), sans l'activité de ligase.

Les revendications 2 à 13 dépendent de la revendication 1 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions requises par le PCT en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.

2. Aucune ARN polymérase connue dans l'état antérieur de la technique ne possède toutes les caractéristiques de celle faisant l'objet de la revendication 14. Le contenu de cette revendication est donc nouveau (Art. 33(2) PCT).

Le problème objectif réside donc dans la fourniture d'une nouvelle ARN polymérase ARN dépendante.

De D1, il est connu que la T7 ARN polymérase peut transcrire, sous la dépendance d'un promoteur, une séquence quelconque d'ADN en l'absence de facteur protéique associé. Il est également connu de l'état antérieur de la technique que la T7 ARN polymérase est capable de transcrire de l'ARN.

L'homme du métier aurait donc été amplement motivé pour modifier une telle enzyme dans le but de la rendre RNA dépendante. De plus, l'état de la technique lui aurait fourni les éléments nécessaires (voir ci-dessous).

Le contenu de la revendication 14 n'implique donc pas d'activité inventive (Art. 33(3) PCT).

3. En se basant sur les résultats obtenus dans D2 (résumé, introduction et p.4620, c.1, dernier § complet) et les relations structure/fonction présentées dans D4 (p.389 et 390) et D5, il apparaît évident pour l'homme du métier de modifier par mutation le motif B responsable de l'association avec le brin matrice, en introduisant cette mutation par exemple à la position 631 ou 639 (D4, p.389) ou en remplaçant ce motif B par le motif B' d'une ARN polymérase ARN dépendante (D5, p. 186).

Les revendications dépendantes 15 à 24 ne contiennent donc aucune caractéristique qui, en combinaison avec celles de l'une quelconque des revendications à laquelle elles se réfèrent, définisse un objet qui satisfasse aux exigences du PCT en ce qui concerne l'activité inventive (Art. 33(3) PCT).

4. Au vu de ces arguments, la résolution du problème mentionné ci-dessus implique forcément le contenu des revendications 25 à 28 qui représentent des "outils" et un procédé standards pour l'homme du métier. Comme l'ARN polymérase, objet des revendications 14 à 24, n'implique pas d'activité inventive, il en est de même pour les revendications 25 à 28 (Art. 33(3) PCT).
5. L'objet de la revendication 29 est nouveau (Art. 33(2) PCT) car ni l'activité ARN polymérase ARN dépendante sous la dépendance d'un promoteur des T7 et SP6 ARN polymérase, ni des ARN polymérases mutantes possédant de telles

fonctions, n'étaient connues dans l'état antérieur de la technique.

Néanmoins, comme des arguments similaires à ceux du point 3 ci-dessus s'appliquent au contenu de la revendication 29, celle-ci n'implique pas d'activité inventive (Art. 33(3) PCT).

6. Le procédé (B) cité au point 1 ci-dessus et divulgué dans le document D1 mentionne l'utilisation d'ARN polymérase ARN-dépendante (p.2, l.42) pour la transcription d'une matrice (considérée comme étant entièrement constitué d'ARN) sous la dépendance d'un promoteur (p.7, l. 28-29). L'absence de facteurs protéiques auxiliaires est implicite.  
Ce procédé est donc préjudiciable pour la nouveauté de la revendication 30 telle qu'initialement déposée (Art. 33(2) PCT).
7. Comme aucune activité ARN polymérase ARN dépendante, sous la dépendance d'un promoteur et en l'absence de facteur protéique auxiliaire n'était connue ni rendu évidente par l'état de la technique pour une ARN polymérase sauvage de virus ou de phage, l'objet des revendications 31 et 32 implique une activité inventive (Art. 33(3) PCT).

## **Section VII**

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1 à D3 et ne cite pas ces documents.

## **Section VIII**

1. L'expression "l'une au moins des propriétés ..." utilisée dans la revendication 28 est vague et équivoque, et laisse un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles elle se réfère. Par exemple la sélection d'une ARN polymérase caractérisée uniquement par sa capacité de synthèse en l'absence de facteur protéique associé n'est pas cohérent avec la définition de

l'ARN polymérase que l'on désire obtenir (objet de la revendication 14, citée en référence au début de la revendication 28). L'objet de cette revendication n'est donc pas clairement défini (article 6 PCT).

2. La description des résultats obtenus avec une T7 polymérase mutée (p.27, l. 24-25) n'est pas consistant avec la figure 5 (puit 1 : pas de transcrit de 33 bases visible), ce qui rend l'exemple 2 non significatif.

des propriétés d'une ARN polymérase telle que définie dans l'une quelconque des revendications 14 et 15.

29. Utilisation d'une ARN polymérase capable de transcrire une matrice d'ARN, sous la dépendance d'un promoteur, 5 en l'absence de facteur protéique auxiliaire, dans un procédé de transcription d'un brin matrice comprenant une séquence cible d'ARN, dans laquelle ladite ARN polymérase est choisie parmi la T7 ARN polymérase, la SP6 ARN polymérase et les ARN polymérases telles que définies dans l'une quelconque des revendications 14 à 10 24.

30. Utilisation d'une ARN polymérase capable de transcrire une matrice d'ARN, sous la dépendance d'un promoteur, en l'absence de facteur protéique auxiliaire, dans un procédé de transcription d'un brin matrice comprenant une séquence cible 15 d'ARN, dans laquelle ledit brin matrice est constitué d'ARN à partir d'une des positions +1 à +5 jusqu'à l'extrémité 5' du brin matrice, et est constitué d'ADN à partir de ladite position jusqu'à l'extrémité 3' du brin matrice lorsque ladite extrémité 3' ne coïncide pas avec ladite position.

20 31. Utilisation selon la revendication précédente, dans laquelle ladite ARN polymérase est une ARN polymérase sauvage de virus ou de phage.

32. Utilisation selon la revendication précédente, dans laquelle ladite ARN polymérase est choisie parmi la T7-, la T3- et 25 la SP6- ARN polymérase.

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/54, 9/12, C12Q 1/68</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/45449</b>  (43) Date de publication internationale: 15 octobre 1998 (15.10.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00635		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Date de dépôt international: 27 mars 1998 (27.03.98)			
(30) Données relatives à la priorité: 97/04166 4 avril 1997 (04.04.97) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy l'Etoile (FR).			
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHEYNET-SAUVION, Valérie [FR/FR]; Les Aullieux, F-42410 Verin (FR). ARNAUD-BARBE, Nadège [FR/FR]; 15, rue Imbert Colomès, F-69001 Lyon (FR). ORIOL, Guy [FR/FR]; 11, rue Jean-Baptiste Rivory, F-42400 Saint Chamond (FR). McALLISTER, William [US/US]; 59-L Reading Road, Edison, NJ 08817 (US). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR). MALLET, François [FR/FR]; 84, rue Anatole France, F-69100 Villeurbanne (FR).			
(74) Mandataire: TONNELLIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).			
(54) Title: RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FUNCTIONING PREFERABLY ON RNA MATRIX AND PROMOTER-DEPENDENT TRANSCRIPTION PROCESS WITH SAID RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE			
(54) Titre: ARN-POLYMERASE ARN-DEPENDANTE FONCTIONNANT PREFERENTIELLEMENT SUR MATRICE D'ARN ET PROCEDE DE TRANSCRIPTION D'ARN SOUS LA DEPENDANCE D'UN PROMOTEUR AVEC L'EDIT ARN POLYMERASE ARN-DEPENDANTE			
(57) Abstract			
<p>Disclosed is a process for transcribing RNA using a nucleotide reagent as the promoter. Such a reagent enables any type of RNA to be transcribed without sequence specification and without protein cofactors, by means of an RNA polymerase that is known to be DNA-dependent such as the RNA polymerase of the phage T7, or by means of new, mutated RNA polymerase with the ability to synthesize a transcription product of a polynucleotide matrix with a higher yield when the matrix is RNA than when said matrix is DNA. This type of RNA polymerase can be obtained by effecting mutations on a coding gene for a wild-type RNA polymerase, and then by selecting the mutated RNA polymerase with said ability. The invention can be applied notably to the detection, synthesis or quantification of RNA.</p>			
(57) Abrégé			
<p>Procédé de transcription d'ARN polymérase à l'aide d'un réactif nucléotidique jouant le rôle de promoteur. Un tel réactif permet de transcrire un ARN quelconque, sans spécificité de séquence, et en l'absence de cofacteurs protéiques, à l'aide d'ARN polymérases connues comme étant ADN dépendantes, telles que l'ARN polymérase du phage T7, ou encore à l'aide de nouvelles ARN polymérases mutées ayant la propriété de synthétiser un produit de transcription d'une matrice polynucléotidique avec un meilleur rendement lorsque la matrice est de l'ARN que lorsque la matrice est de l'ADN. Une telle ARN polymérase peut être obtenue en effectuant des mutations sur un gène codant pour une ARN polymérase de type sauvage et en sélectionnant les ARN polymérases mutées ayant ladite propriété. Application notamment à la détection, la synthèse ou la quantification d'ARN.</p>			

*UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Liberia	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau international le 9 novembre 1998 (09.11.98);  
revendication 1 modifiée; autres revendications inchangées (1 page)]

1. Procédé d'amplification d'une séquence cible quelconque d'ARN, par transcription sous la dépendance d'un promoteur, dans un échantillon d'ARN comprenant ladite séquence cible, dans lequel on met en contact ledit échantillon :

5 - avec un réactif capable de s'hybrider avec ledit ARN comprenant ladite séquence cible,

10 - en l'absence de désoxyribonucléosides triphosphates,

- et avec un système enzymatique comprenant une activité d'ARN polymérase ARN-dépendante,

15 dans des conditions permettant l'hybridation dudit réactif avec ledit ARN comprenant ladite séquence cible et dans des conditions permettant le fonctionnement de ladite activité d'ARN polymérase ARN-dépendante ;

dans lequel ledit réactif contient :

20 (i) un premier brin nucléotidique comprenant : a) un premier segment nucléotidique capable de jouer le rôle de brin sens d'un promoteur pour ladite activité d'ARN polymérase et b), en aval dudit premier segment, un second segment nucléotidique comprenant une séquence capable d'hybridation avec une région dudit ARN, et

25 (ii), à l'état hybridé sur le premier brin, un second brin nucléotidique comprenant un troisième segment nucléotidique capable d'hybridation avec ledit premier segment de façon à former avec lui un promoteur double brin fonctionnel ; et dans lequel ladite activité d'ARN polymérase est capable de transcrire une matrice d'ARN, en présence dudit réactif hybridé 30 sur ladite matrice, en l'absence de facteur protéique associé et en l'absence d'une activité de ligase.

35 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ledit troisième segment est flanqué, à son extrémité amont, par un quatrième segment nucléotidique qui est plus court que ledit second segment du premier brin.

3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel ledit quatrième segment est capable d'hybridation avec une partie en regard dudit second segment.

**DECLARATION SELON L'ARTICLE 19**

Le procédé de la revendication 1 est un procédé de transcription, c'est-à-dire un procédé de synthèse d'ARN, sous la dépendance d'un promoteur, dans des conditions permettant le fonctionnement d'une activité d'ARN polymérase ARN-dépendante.

Il est évident que lesdites conditions comprennent la présence de ribonucléosides triphosphates.

Le procédé de la revendication 1 ne concerne pas la synthèse d'ADN, comme cela est d'ailleurs confirmé par l'ensemble de la description, de sorte qu'il est implicite, et tout à fait évident pour un homme du métier, que le procédé revendiqué est effectué en l'absence de désoxyribonucléosides triphosphates.

C'est cette absence qui a été précisée dans la nouvelle revendication 1 présentée.

## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International patent classification <sup>6</sup> :  C12N 15/54, 9/12, C12Q 1/68		A1	(11) International publication number: WO 98/45449  (43) International publication date: 15 October 1998 (15.10/98)
(21) International application number: PCT/FR98/00635		(81) Designated states: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) International filing date: 27 March 1998 (27.03.98)			
(30) Data relating to the priority: 97/04.166 4 April 1997		FR	
(71) Applicant (for all designated States except US): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy l'Etoile (FR).			
(72) Inventors; and			
(75) Inventors/Applicants (US only): CHEYNET-SUVION, Valériè [FR/FR]; Les Aullieux, F-42410 Verin (FR). ARNAUD-BARBE, Nadège [FR/FR]; 15, rue Imbert Colomès, F-69001 Lyon (FR). ORIOL, Guy [FR/FR]; 11, rue Jean-Baptiste Rivory, F-42400 Saint Chamond (FR). McALLISTER, William [US/US]; 59-L Reading Road, Edison, NJ 08817 (US). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR).			
(74) Representative: TONNELLIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).			

As printed

(54) Title: RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FUNCTIONING PREFERABLY ON RNA MATRIX AND PROMOTER-DEPENDENT TRANSCRIPTION PROCESS WITH SAID RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE

(54) Titre: ARN-POLYMERASE ARN-DEPENDANTE FONCTIONNANT PREFERENTIELLEMENT SUR MATRICE D'ARN ET PROCEDE DE TRANSCRIPTION D'ARN SOUS LA DEPENDANCE D'UN PROMOTEUR AVEC LEDIT ARN POLYMERASE ARN-DEPENDANTE

## (57) Abstract

Disclosed is a process for transcribing RNA using a nucleotide reagent as the promoter. Such a reagent enables any type of RNA to be transcribed without sequence specification and without protein cofactors, by means of an RNA polymerase that is known to be DNA-dependent such as the RNA polymerase of the phage T7, or by means of new, mutated RNA polymerase with the ability to synthesize a transcription product of a polynucleotide matrix with a higher yield when the matrix is RNA than when said matrix is DNA. This type of RNA polymerase can be obtained by effecting mutations on a coding gene for a wild-type RNA polymerase, and then by selecting the mutated RNA polymerase with said ability. The invention can be applied notably to the detection, synthesis or quantification of RNA.

## (57) Abrégé

Procédé de transcription d'ARN polymérase à l'aide d'un réactif nucléotidique jouant le rôle de promoteur. Un tel réactif permet de transcrire un ARN quelconque, sans spécification de séquence, et en l'absence de cofacteurs protéiques, à l'aide d'ARN polymérases connues comme étant ADN dépendantes, telles que l'ARN polymérase du phage T7, ou encore à l'aide de nouvelles ARN polymérases mutées ayant la propriété de synthétiser un produit de transcription d'une matrice polynucléotidique avec un meilleur rendement lorsque la matrice est de l'ARN que lorsque la matrice est de l'ADN. Une telle ARN polymérase peut être obtenue en effectuant des mutations sur un gène codant l'ARN polymérase de type sauvage et en sélectionnant les ARN polymérases mutées ayant ladite propriété. Application notamment à la détection, la synthèse ou la quantification d'ARN.

**ONLY FOR INFORMATION**

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia-Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	Former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Fasso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	IU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Vietnam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Ivory Coast	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/54, 9/12, C12Q 1/68</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/45449</b> (43) Date de publication internationale: 15 octobre 1998 (15.10.98)		
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00635	(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).				
(22) Date de dépôt international: 27 mars 1998 (27.03.98)					
(30) Données relatives à la priorité: 97/04166 4 avril 1997 (04.04.97) FR					
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy l'Etoile (FR).					
(72) Inventeurs; et					
(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHEYNET-SAUVION, Valérie [FR/FR]; Les Aullieux, F-42410 Verin (FR). ARNAUD-BARBE, Nadège [FR/FR]; 15, rue Imbert Colomès, F-69001 Lyon (FR). ORIOL, Guy [FR/FR]; 11, rue Jean-Baptiste Rivory, F-42400 Saint Chamond (FR). McALLISTER, William [US/US]; 59-L Reading Road, Edison, NJ 08817 (US). MANDRAND, Bernard [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR). MALLET, François [FR/FR]; 84, rue Anatole France, F-69100 Villeurbanne (FR).					
(74) Mandataire: TONNELLIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).					
(54) Title: RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FUNCTIONING PREFERABLY ON RNA MATRIX AND PROMOTER-DEPENDENT TRANSCRIPTION PROCESS WITH SAID RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE		Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.			
(54) Titre: ARN-POLYMERASE ARN-DEPENDANTE FONCTIONNANT PREFERENTIELLEMENT SUR MATRICE D'ARN ET PROCEDE DE TRANSCRIPTION D'ARN SOUS LA DEPENDANCE D'UN PROMOTEUR AVEC LEDIT ARN POLYMERASE ARN-DEPENDANTE					
(57) Abstract					
Disclosed is a process for transcribing RNA using a nucleotide reagent as the promoter. Such a reagent enables any type of RNA to be transcribed without sequence specification and without protein cofactors, by means of an RNA polymerase that is known to be DNA-dependent such as the RNA polymerase of the phage T7, or by means of new, mutated RNA polymerase with the ability to synthesize a transcription product of a polynucleotide matrix with a higher yield when the matrix is RNA than when said matrix is DNA. This type of RNA polymerase can be obtained by effecting mutations on a coding gene for a wild-type RNA polymerase, and then by selecting the mutated RNA polymerase with said ability. The invention can be applied notably to the detection, synthesis or quantification of RNA.					
(57) Abrégé					
Procédé de transcription d'ARN polymérase à l'aide d'un réactif nucléotidique jouant le rôle de promoteur. Un tel réactif permet de transcrire un ARN quelconque, sans spécificité de séquence, et en l'absence de cofacteurs protéiques, à l'aide d'ARN polymérases connues comme étant ADN dépendantes, telles que l'ARN polymérase du phage T7, ou encore à l'aide de nouvelles ARN polymérases mutées ayant la propriété de synthétiser un produit de transcription d'une matrice polynucléotidique avec un meilleur rendement lorsque la matrice est de l'ARN que lorsque la matrice est de l'ADN. Une telle ARN polymérase peut être obtenue en effectuant des mutations sur un gène codant pour une ARN polymérase de type sauvage et en sélectionnant les ARN polymérases mutées ayant ladite propriété. Application notamment à la détection, la synthèse ou la quantification d'ARN.					

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Liberia	SG	Singapour		
EE	Estonie						

ARN POLYMERASE ARN-DEPENDANTE FONCTIONNANT PREFERENTIELLEMENT SUR MATRICE D'ARN ET PROCEDE DE TRANSCRIPTION D'ARN SOUS LA DEPENDENCE D'UN PROMOTEUR AVEC LEDIT ARN POLYMERASE ARN-DEPENDANTE

L'invention a pour objet un procédé de transcription, permettant de synthétiser des brins d'ARN complémentaires d'une matrice d'ARN, ainsi que de nouvelles ARN polymérasées permettant de mettre en œuvre ce procédé.

Le procédé de l'invention conduit à l'amplification d'ARN présent en faibles quantités dans un échantillon biologique, et permet ainsi la détection et/ou la quantification de l'ARN de l'échantillon, ou le séquençage du produit de l'amplification, notamment dans le domaine de la microbiologie et de la virologie, et plus généralement dans le domaine du diagnostic médical. Le procédé de l'invention peut également être utilisé dans la synthèse de sondes d'ARN.

On sait qu'en microbiologie et en virologie, les micro-organismes recherchés sont souvent des bactéries viables (et contenant donc davantage d'ARN que d'ADN) ou des virus à ARN comme les virus HIV et HCV. On sait également que dans diverses pathologies, il peut être intéressant de suivre les variations de l'expression des gènes, et donc de la synthèse d'ARN messager.

Il est donc important de pouvoir disposer d'un procédé simple et efficace d'amplification d'une cible d'ARN.

La méthode PCR, qui permet d'amplifier cycliquement une cible d'ADN, utilise une seule enzyme mais nécessite la réalisation de cycles de températures, généralement à trois températures différentes. La méthode PCR peut être adaptée à l'amplification d'une cible d'ARN en ajoutant une activité enzymatique supplémentaire d'ADN polymérase ARN dépendante, ce qui complique encore davantage cette méthode.

La méthode d'amplification dite NASBA/TMA présente l'avantage d'être une méthode isotherme, mais nécessite la mise en œuvre de trois activités enzymatiques (ADN polymérase ARN dépendante, RNase H, et ARN polymérase ADN dépendante) portées par deux ou trois enzymes.

Il est donc souhaitable de pouvoir disposer d'une méthode simple et automatisable d'amplification d'ARN, et en particulier d'une méthode isotherme n'utilisant qu'une seule enzyme.

Pour éviter les inconvénients, qui viennent d'être évoqués, des techniques d'amplification connues, il apparaît donc nécessaire d'utiliser, pour l'amplification d'ARN, une activité d'ARN polymérase ARN dépendante.

5 Malheureusement, les ARN polymérases ARN dépendantes (ARNp ARNd) naturelles connues ne sont pas adaptées à une telle utilisation, car elles ont des exigences spécifiques en ce qui concerne la matrice d'ARN, et leur activité nécessite la présence de co-facteurs protéiques (dits aussi facteurs protéiques auxiliaires ou facteurs protéiques associés).

10 On a maintenant découvert que certaines ARN polymérases ADN-dépendantes connues sont capables de transcrire un ARN simple brin en présence d'un promoteur d'ADN bicaténaire. De plus, certaines de ces enzymes, transformées par mutation, sont capables 15 de synthétiser un produit de transcription avec un meilleur rendement lorsque la matrice est constituée d'ARN que lorsque la matrice est constituée d'ADN.

20 Dans la présente demande, le terme "transcription" désigne la synthèse de plusieurs brins d'ARN en présence d'une matrice polynucléotidique et de ribonucléosides triphosphates, dans un milieu réactionnel approprié et dans des conditions permettant 25 à l'activité catalytique d'une ARN polymérase de s'exercer. La transcription s'effectue par synthèse d'une copie, complémentaire et anti-parallèle, de la matrice. Le brin de la matrice qui est copié est appelé brin transcrit ou brin matrice. La synthèse de l'ARN progresse dans le sens 5' - 3'.

30 On sait que certaines ARN polymérases fonctionnent sous la dépendance d'un promoteur. Un promoteur est une séquence nucléotidique double brin reconnue pour l'ARN polymérase et nécessaire à l'initiation de la transcription.

35 On rappelle que lorsque le brin matrice est lié au promoteur, le premier nucléotide transcrit sur le brin matrice, lié par son extrémité 3' à l'extrémité 5' de l'un des brins du promoteur, est désigné par +1. Le brin du promoteur qui est lié au brin matrice est appelé brin anti-sens. L'autre brin du promoteur, complémentaire du brin anti-sens, et hybridé à celui-ci, est appelé brin sens. Les nucléotides successifs qui sont situés

du côté du promoteur, par rapport au nucléotide +1, sont, en partant de +1, numérotés -1, -2, -3, etc.

La position - 1 correspond donc à l'extrémité 5' du brin anti-sens du promoteur, et à l'extrémité 3' du brin sens. Cependant, certains auteurs incluent la séquence nucléotidique correspondant à la région où débute la transcription (notamment la séquence de +1 à +6, pour laquelle on peut généralement définir une séquence consensus) dans la définition de la séquence du promoteur.

Sur le brin matrice, les positions des nucléotides successifs copiés, à partir de +1, et donc dans la direction 3' - 5', sont notées +2, +3, etc ...

Dans ce qui suit, on parle généralement de brin sens et de brin anti-sens pour le promoteur proprement dit (positions numérotées négativement), et on parle de brin non-matrice pour tout brin lié à l'extrémité 3' du brin sens, et de brin matrice pour tout brin lié à l'extrémité 5' du brin anti-sens ou pour tout brin hybridé au brin non-matrice. Dans un brin polynucléotidique donné, on appelle "région amont" une région située du côté de l'extrémité 5', et "région aval" une région située du côté de l'extrémité 3'. Cependant, dans le domaine de la transcription sous la dépendance d'un promoteur, et sans prendre en considération un brin particulier, on appelle traditionnellement région "amont" la région qui, par rapport à la position +1, se trouve du côté du promoteur (positions indiquées par des nombres négatifs), et région "aval" la région située du côté de la matrice copiée (positions indiquées par des nombres positifs), de sorte que la direction aval correspond alors au sens 3'- 5' sur le brin matrice, et au sens 5'- 3' sur le brin d'ARN néosynthétisé.

Le brin matrice n'est pas nécessairement lié à l'extrémité 5' du brin anti-sens du promoteur. Mais il doit être dans ce cas hybridé à un brin complémentaire et anti-parallèle (brin non-matrice) lui-même lié par son extrémité 5' à l'extrémité 3' du brin sens du promoteur ; voir ZHOU W. et DOETSCH P.W., *Biochemistry* 33, 14926-14934 (1994) et ZHOU W. et al., *Cell* 82, 577-585 (1995). Dans un tel cas, la transcription peut débuter en toute position , pouvant aller de +1 à + 24 , correspondant à

l'extrémité 3' du brin matrice ou de la partie du brin matrice hybridée sur le brin non matrice.

Comparées aux ARN polymérases bactériennes, eucaryotes ou mitochondriales, les ARN polymérases phagiques sont des enzymes très simples. Parmi celles-ci, les mieux connues sont les ARN polymérases des bactériophages T7, T3 et SP6. L'ARN polymérase du bactériophage a été clonée ; voir notamment le brevet US 4 952 496. Ces enzymes sont très homologues entre elles et sont formées par une seule sous-unité. Les promoteurs naturels spécifiques des ARN polymérases des phages T7, T3 et SP6 sont bien connus. Le séquençage du génome entier du bactériophage T7 (Dunn et al., *J. Mol. Biol.* **166**, 477-535 (1983)) a permis de définir l'existence de 17 promoteurs sur l'ADN de ce phage. La comparaison de ces 17 séquences montre que 23 nucléotides contigus situés entre les positions - 17 et + 6 par rapport au site d'initiation (position +1) de la transcription, sont fortement conservés. Ces nucléotides sont même identiques chez cinq promoteurs dits de classe III, qui sont les plus efficaces notamment *in vitro*. De même, de nombreuses séquences promotrices spécifiques pour la T3 ARN polymérase présentent également une homologie très importante, notamment entre les positions - 17 et + 6. Par ailleurs, plusieurs séquences différentes de promoteur pour l'ARN polymérase du phage SP6 ont été mises en évidence et présentent également une forte homologie ; voir Brown J.E., et al., *Nucleic Acids Res.* **14**, 3521-3526 (1986).

Il est donc possible de considérer que les diverses ARN polymérases phagiques mentionnées ci-dessus font partie d'une famille d'ARN polymérases qui reconnaissent des promoteurs présentant une séquence consensus de la position - 17 à la position + 6, et notamment de la position - 17 à la position - 1.

Le procédé de l'invention permet de transcrire une séquence quelconque d'ARN, car les ARN polymérases, capables de transcrire de l'ARN sous la dépendance d'un promoteur, qui sont décrites dans la présente demande, peuvent transcrire l'ARN sans spécificité importante de séquence. On sait toutefois que certaines séquences de début de transcription, notamment de la position + 1 à la position + 6, sont plus favorables que d'autres pour ob-

tenir des transcrits de longueur attendue avec une ARN polymérase phagique donnée, dans le cas de la transcription d'ADN ; voir par exemple Milligan J. F. et al., *Nucleic Acids Research*, 15, 8783-8798 (1987). Les ARN polymérases capables de transcrire de l'ARN qui sont décrites dans la présente demande peuvent elles aussi fonctionner avec des rendements variables selon la séquence de la région de début de transcription. Les séquences qui conviennent le mieux à une ARN polymérase donnée peuvent être déterminées, le cas échéant, par de simples expériences de routine analogues à celles décrites par Milligan et al. dans l'article qui vient d'être mentionné. En outre, comme on le verra ci-après, le procédé de transcription de l'invention permet, le cas échéant, soit de faire débuter la transcription dans une région favorable de l'ARN à transcrire, soit de fournir un réactif-promoteur qui contient déjà une région de début de transcription ayant une séquence favorable pour une ARN polymérase donnée.

La présente invention a donc pour objet un procédé d'amplification d'une séquence cible quelconque d'ARN, par transcription sous la dépendance d'un promoteur, dans un échantillon d'ARN comprenant ladite séquence cible,

dans lequel on met en contact ledit échantillon :

- avec un réactif capable de s'hybrider avec ledit ARN comprenant ladite séquence cible,

- et avec un système enzymatique comprenant une activité d'ARN polymérase ARN-dépendante,

dans des conditions permettant l'hybridation dudit réactif avec ledit ARN comprenant ladite séquence cible et dans des conditions permettant le fonctionnement de ladite activité d'ARN polymérase ARN-dépendante ;

dans lequel ledit réactif contient :

(i) un premier brin nucléotidique comprenant : a) un premier segment nucléotidique capable de jouer le rôle de brin sens d'un promoteur pour ladite activité d'ARN polymérase et b), en aval dudit premier segment, un second segment nucléotidique comprenant une séquence capable d'hybridation avec une région dudit ARN, et

(ii) à l'état hybridé sur le premier brin, un second brin nucléotidique comprenant un troisième segment nucléotidique capable d'hybridation avec ledit premier segment de façon à former avec lui un promoteur double brin fonctionnel ;

5 et dans lequel ladite activité d'ARN polymérase est capable de transcrire une matrice d'ARN, en présence dudit réactif hybridé sur ladite matrice, en l'absence de facteur protéique associé et en l'absence d'une activité de ligase.

10 Les conditions générales permettant l'hybridation de brins nucléotidiques sont connues, et des conditions particulières peuvent être facilement déterminées, par des expériences de routine, pour des brins de séquence donnée. Les conditions permettant le fonctionnement de l'activité d'ARN polymérase, en présence de ribonucléosides triphosphates, peuvent être elles aussi 15 facilement déterminées parl'expérience, éventuellement avec l'aide des indications fournies dans la partie expérimentale ci-après.

20 L'extrémité 3' du premier segment correspond à la position -1 dans le système transcriptionnel utilisé. Le premier segment contient un nombre suffisant de nucléotides pour pouvoir, à l'état hybridé, jouer le rôle d'un promoteur pour une ARN polymérase. Selon un mode de réalisation particulier, le premier segment contient au moins 9 nucléotides.

25 Dans le brevet FR 2 714 062, il a été montré que des séquences courtes de 6 à 9 nucléotides consécutifs choisis dans la région -12 à -4 du brin sens d'un promoteur pour une ARN polymérase phagique sont capables de jouer le rôle de promoteurs fonctionnels dans la transcription d'une séquence cible d'ADN.

30 Le réactif utilisé dans le procédé de l'invention peut encore présenter l'une au moins des caractéristiques suivantes :

- ledit troisième segment est flanqué, à son extrémité amont, par un quatrième segment nucléotidique qui est plus court que ledit second segment du premier brin ;

35 - ledit quatrième segment est capable d'hybridation avec une partie en regard dudit second segment.

- lesdits premier et troisième segments sont constitués d'ADN ;

- lesdits troisième et quatrième segments sont constitués d'ADN ou d'ARN.

Le troisième segment peut avoir la même longueur que le premier segment. Il peut être aussi plus court ou plus long, mais 5 son extrémité 5' doit correspondre à la position -1 (c'est-à-dire la position précédant immédiatement la position de début de transcription dans le cas où le brin matrice est lié au promoteur), lorsqu'il est hybridé sur le premier segment.

Lorsque le second brin du réactif ne contient pas le quatrième segment, le réactif peut être utilisé notamment pour transcrire un ARN dont la région d'extrémité 3', ou une région voisine de l'extrémité 3', a une séquence connue, et dans ce cas le second segment nucléotidique du premier brin est construit de façon que ledit ARN, au voisinage de son extrémité 3', soit capable 10 d'hybridation avec au moins une partie de la séquence dudit second segment nucléotidique. L'extrémité 3' de la partie de l'ARN à transcrire qui est hybridée au second segment peut être contiguë à l'extrémité 5' du troisième segment, ou bien elle peut 15 en être éloignée par un nombre x de nucléotides (comptés sur le second segment), x représentant zéro ou un nombre entier de 1 à 20 24. Bien entendu, la longueur du second segment (en nombre de nucléotides) est supérieure à x, pour pouvoir assurer la fixation de la matrice ARN à transcrire, par hybridation sur une région aval du second segment.

Le quatrième segment, contenant par exemple de 1 à 18 nucléotides, et en particulier de 1 à 12 nucléotides, a de préférence une séquence choisie pour favoriser le début de la transcription pour une ARN polymérase donnée (voir notamment la partie expérimentale ci-après). Le quatrième segment peut être 25 réalisé notamment en ADN. Sa séquence peut être complémentaire de la région amont du second segment qui lui fait face et à laquelle il est alors hybridé. Dans ce cas, le choix de la séquence de la région 5' du deuxième segment est dicté par le choix 30 de la séquence du quatrième segment. Il n'est pas nécessaire que le quatrième segment soit lié au troisième segment puisque de toute façon son positionnement correct en vue de favoriser le début 35 de la transcription peut être assuré par son hybridation au

second segment. Toutefois, dans un mode de réalisation particulier, le quatrième segment est lié au troisième segment.

Comme précédemment, l'extrémité 3' de la partie de l'ARN cible qui est hybridée sur le second segment peut être éloignée 5 de l'extrémité 5' du quatrième segment par un nombre de nucléotides égal à x, tel que défini ci-dessus.

Pour des raisons évidentes, le second segment contient 10 un nombre de nucléotides au moins égal à la somme du nombre de nucléotides du quatrième segment, s'il est présent, et du nombre de nucléotides de ladite séquence du second segment qui est capable d'hybridation avec ladite région de l'ARN à transcrire.

Le procédé de transcription de l'invention peut être mis 15 en œuvre avec une ARN polymérase de type sauvage de virus ou de phage, et en particulier avec une ARN polymérase choisie dans la famille des ARN polymérasées, mentionnée ci-dessus, qui inclut la T7 ARN polymérase, la T3 ARN polymérase et la SP6 ARN polymérase.

On a en effet découvert que ces ARN polymérasées, connues pour être ADN-dépendantes, étaient également capables de transcrire une matrice d'ARN, éventuellement en choisissant (par exemple grâce au quatrième segment décrit ci-dessus), une séquence favorisant le début de la transcription.

La découverte de cette activité d'ARN polymérase ARN-dépendante permet de disposer pour la première fois d'ARN polymérasées capables de transcrire de l'ARN sous la dépendance d'un 25 promoteur, dès la position +1, et en l'absence de facteur protéique associé.

On peut également mettre en œuvre le procédé de l'invention avec des ARN polymérasées mutées qui seront décrites plus en détail ci-après. L'intérêt de ces ARN polymérasées mutées est 30 que certaines d'entre elles sont capables d'effectuer la transcription avec un meilleur rendement lorsque la matrice est constituée d'ARN que lorsque la matrice est constituée d'un ADN comparable (c'est-à-dire contenant les désoxyribonucléotides A, C, G à la place des ribonucléotides A, C, G, respectivement, et contenant 35 le désoxyribonucléotide T à la place du ribonucléotide U).

L'invention concerne également l'utilisation d'une ARN polymérase capable de transcrire une matrice d'ARN, sous la dé-

pendance d'un promoteur, en l'absence de facteur protéique auxiliaire, dans un procédé de transcription d'un brin matrice comprenant une séquence cible d'ARN dans laquelle ladite ARN polymérase est choisie parmi la T7 ARN, la SP6 ARN polymérase et les 5 ARN polymérases mutées telles que définies ci-dessus. Le brin matrice peut être constitué d'ARN, ou encore être constitué d'ADN dans la région de début de transcription, puis d'ARN ensuite.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'une ARN polymérase capable de transcrire une matrice d'ARN, sous la dépendance d'un promoteur, en l'absence de facteur protéique auxiliaire, dans un procédé de transcription d'un brin matrice comprenant une séquence cible d'ARN, dans laquelle ledit brin matrice est constitué d'ARN au moins entre la position +5 et l'extrémité 5' de la cible. Le brin matrice est donc constitué 10 d'ARN à partir d'une des positions +1 à +5, et peut donc être constitué d'ADN de la position +1 à la position +2, +3 ou +4. 15 L'article de S. Leary et al. mentionné ci-après décrit la transcription d'une matrice constituée d'ADN pour les positions +1 à +6 puis d'ARN pour les positions 7 et suivantes, avec la T3 ARN 20 polymérase.

L'invention concerne également des ARN polymérases ARN-dépendantes (ARNpARNd), obtenues par modification d'ARN polymérases ADN-dépendantes, et qui sont capables de synthétiser des brins d'ARN complémentaires d'une matrice d'ARN. Elles peuvent 25 être utilisées par exemple dans le séquençage d'ARN, la synthèse de sondes d'ARN, et les techniques d'amplification permettant en particulier la détection et la quantification d'ARN.

Les ARNpARNd naturelles connues ne sont pas adaptées pour servir de polymérases dans plusieurs applications, parce qu'elles 30 ont acquis une forte capacité discriminatoire vis-à-vis de leur ARN matrice spécifique. De plus, ces enzymes ne sont pas bien caractérisées. Pour la plupart, elles forment des complexes supra-moléculaires composés à la fois de facteurs viraux et cellulaires ; ces complexes, qui sont généralement associés aux membranes, sont difficiles à purifier et sont instables au cours de 35 l'isolement (B. N. Fields, D. M. Knipe, *Virology*. Vols 1 and 2, Raven Press, New York, (1990) ; G. P. Pfeifer, R. Drouin, G. P.

Holmquist, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **288**, 39 (1993)).

Peu d'ARNpARNd ont été clonées, séquencées et exprimées. L'enzyme Q $\beta$  réplicase est la mieux caractérisée. Cette enzyme est 5 composée de 4 sous-unités, dont 3 sont des facteurs de l'hôte (M. Kajitani, A. Ishihama, *Nucleic Acids Res.* **19**, 1063 (1991)). L'enzyme Q $\beta$  a été isolée ; elle montre une bonne processivité et est capable de réaliser des réactions cycliques (P. M. Lizardi, C. E. Guerra, H. Lomeli, I. Tussie-Luna, F. R. Kramer, *Bio/Technology* 10 **6**, 1197 (1988)). Cependant, cette enzyme reste très limitée dans ses applications car elle ne reconnaît comme matrice qu'une classe restreinte de molécules d'ARN fortement structurées (V. D. Axelrod, E. Brown, C. Priano, D. R. Mills, *Virology* **184**, 595 (1991)).

15 Une autre ARNpARNd a été partiellement caractérisée. Il s'agit de l'enzyme du virus L-A de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette polymérase, qui a été clonée, est nécessaire à l'assemblage de la particule virale ; elle se fixe tout d'abord à l'ARN brin plus, puis induit l'assemblage des protéines de la particule (T. Fujimura, R. Esteban, L. M. Esteban, R. B. Wickner, *Cell* **62**, 819 (1990)). Au moins trois facteurs sont connus pour s'associer avec les particules virales. Ces facteurs sont nécessaires à la réplication de l'ARN, à la transcription, et au maintien cohérent de la particule (T. Fujimura, R. B. Wickner, *Molec. Cell. Biol.* **7**, 25 420 (1987)). Les études *in vitro* ont montré qu'une particule virale intacte est nécessaire à la synthèse du brin moins (réplication) (T. Fujimura, R. B. Wickner, *Cell* **55**, 663 (1988)) et à la synthèse du brin plus (transcription) (T. Fujimura, R. B. Wickner, *J. Biol. Chem.* **264**, 10872 (1989)). Ainsi, la complexité de 30 ce système ne le rend pas facilement adaptable à un système de transcription *in vitro*. De plus, tout comme le système Q $\beta$ , ce système est très discriminatoire, acceptant seulement les ARN viraux L-A et M comme matrice (T. Fujimura, R. B. Wickner, *Cell* **55**, 663 (1988)).

35 Une ARNpARNd pour laquelle il a été montré une capacité étendue d'acceptation de matrice est l'enzyme du virus de la po-

liomyélite ( J. Plotch, O. Palant, Y. Gluzman, *J. Virol.* **63**, 216 (1989)). Cependant, plusieurs problèmes existent avec ce système enzymatique : l'amorçage est dépendant soit d'un facteur de l'hôte non identifié soit de l'addition d'un oligonucléotide poly(U). L'amorçage par un oligonucléotide poly(U) n'étant cependant pas sélectif vis-à-vis de la matrice, de nombreux produits de différentes tailles sont synthétisés, notamment des produits ayant deux fois la longueur de la matrice. De plus, la synthèse séquentielle des brins plus et moins n'a pas été démontrée (S. J. Plotch, O. Palant, Y. Gluzman, *J. Virol.* **63**, 216 (1989), T. D. Hey, O. C. Richards, E. Ehrenfeld, *J. Virol.* **61**, 802 (1987), J. M. Lubinski, L. J. Ransone, A. Dasgupta, *J. Virol.* **61**, 2997 (1987)).

Parmi les ARNpADNd, les enzymes des bactériophages T3 et T7 sont capables d'utiliser l'ARN comme matrice dans des conditions particulières. Par exemple, l'ARNpADNd T3 peut transcrire une matrice ARN simple brin (i.e. l'ARN messager du gène de la résistance à la néomycine) si elle est ligaturée au brin anti-sens du promoteur T3 incluant la séquence d'initiation de + 1 à + 6 (S. Leary., H. J. Baum, Z. G. Loewy, *Gene* **106**, 93 (1991)). Il est également connu que la T7 ARN polymérase peut transcrire, d'une extrémité à l'autre, une matrice ARN en l'absence de la séquence promotrice (M. Chamberlin., J. Ring, *J. Biol. Chem.* **248**, 2235 (1973)). De plus, il a été montré que la T7 ARN polymérase peut efficacement transcrire deux petites matrices ARN spécifiques, les ARN "X" et "Y", produisant à la fois des copies d'ARN plus et moins. Cette réplication, obtenue en l'absence d'une séquence promotrice consensus, semble dépendante de la présence d'une structure secondaire spécifique (M. M. Konarska, P. A. Sharp, *Cell* **57**, 423 (1989), M. M. Konarska, P. A. Sharp, *Cell* **63**, 609 (1990)). En revanche, les ARN "X" et "Y" ne sont pas repliqués par la T3 ARN polymérase, et on ne sait pas si cette enzyme n'est pas capable de répliquer des ARN hautement structurés, ou si la spécificité de séquence de cette enzyme empêche sa reconnaissance des ARN "X" et "Y". En l'absence de promoteur, il a également été montré que la T7 ARNpADNd était capable d'effectuer l'elongation de deux brins d'ARN chevauchants en anti-sens (C.

Cazenave and O.C. Uhlenbeck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 6972 (1994)). De même, il a été montré que la T7 ARNpADNd sauvage est capable d'effectuer l'elongation d'une amorce ARN sur matrice ADN simple brin, en l'absence de promoteur (S.S. Daube and P.H. von 5 Hippel, *Biochemistry* **33**, 340 (1994)).

L'enzyme des bactériophages la mieux caractérisée est la T7 ARN polymérase, une enzyme monomère de 98 kDa (B. A. Moffatt, J. J. Dunn, F. W. Studier, *J. Mol. Biol.* **173**, 265 (1984)). Cette polymérase monomère possède toutes les propriétés essentielles 10 d'une ARN polymérase, c'est-à-dire reconnaissance d'un promoteur, initiation de la transcription, elongation et terminaison (M. Chamberlin, T. Ryan, *The Enzymes* **XV**, 87 (1982)). De plus, l'activité catalytique nécessite peu d'éléments, à savoir une matrice, des ribonucléosides triphosphates et l'ion divalent  $Mg^{2+}$ , et elle 15 ne nécessite aucun facteur auxiliaire protéique pour initier ou terminer la transcription, contrairement aux autres ARN polymérases (M. Chamberlin, T. Ryan, *The Enzymes* **XV**, 87 (1982)).

La mutagénèse du gène de la T7 ARN polymérase a permis 20 d'identifier et de définir des régions ou des résidus impliqués dans la fonction polymérase. Une stratégie de mutagenèse a consisté à échanger des éléments entre la T7 ARN polymérase et sa proche cousine la T3 ARN polymérase dont la séquence en acides 25 aminés est identique à 82 % (K. E. Joho, L. B. Gross, N. J. McGraw, C. Raskin, W. T. McAllister, *J. Mol. Biol.* **215**, 31 (1990)). Cette stratégie a conduit à l'identification d'éléments 30 de la polymérase impliqués dans la reconnaissance du promoteur. Il a été montré, par exemple, que la substitution d'un seul acide aminé dans l'enzyme T3 (ou T7) permet à l'enzyme mutée de reconnaître spécifiquement le promoteur T7 (ou T3) hétérologue (C. A. Raskin, G. Diaz, K. Joho, W. T. McAllister, *J. Mol. Biol.* **228**, 506 (1992)). De la même façon, des substitutions réciproques dans 35 les séquences promotrices respectives confèrent au promoteur muté la capacité d'être reconnu par l'enzyme hétérologue (C. A. Raskin, G. Diaz, K. Joho, W. T. McAllister, *J. Mol. Biol.* **228**, 506 (1992)).

La T7 ARN polymérase a été cristallisée et sa structure déterminée à une résolution de 3,3 Å (R. Sousa, Y. J. Chung, J. P. Rose, B. -C. Wang, *Nature* **364**, 593 (1993)). A partir de cette étude structurale, des alignements de séquences (K. E. Joho, L. B. Gross, N. J. McGraw, C. Raskin, W. T. McAllister, *J. Mol. Biol.* **215**, 31 (1990) ; S. Mungal, B. M. Steinberg, L. B. Taichman, *J. Virol.* **66**, 3220 (1992), W. T. McAllister, C. A. Raskin, *Molec. Microbiol.* **10**, 1 (1993)) et des études de mutagenèse (D. Patra, E. M. Lafer, R. Sousa, *J. Mol. Biol.* **224**, 307 (1992) ; 5 L. Gross, W-J. Chen, W. T. McAllister, *J. Mol. Biol.* **228**, 1 (1992)), il a été possible de corrélérer les éléments fonctionnels de l'enzyme T7 aux éléments structuraux. La T7 ARN polymérase peut être divisée en deux domaines fonctionnels : un domaine de reconnaissance du promoteur et un domaine catalytique (R. Sousa, 10 Y. J. Chung, J. P. Rose, B. -C. Wang, *Nature* **364**, 593 (1993), W. T. McAllister, *Cell. Molec. Biol. Res.* **39**, 385 (1993)). 15

L'asparagine 748 de la T7 ARN polymérase a été montrée comme interagissant avec les nucléotides -10 et -11 dans la séquence promoteur, une interaction montrée comme responsable de la spécificité de promoteur (C.A. Raskin, G. Diaz, K. Joho, 20 W.T. McAllister, *J. Mol. Biol.* **228**, 506 (1992)). Il a été évoqué la possibilité qu'une interaction de type sigma entre la T7 polymérase et son promoteur puisse exister dans le système du bactériophage. En effet, une séquence de type sigma, correspondant à la région 2.4 de sigma, i.e. la région de sigma interagissant 25 avec la "Pribnow box" (séquence TATAATG reconnue par le facteur de transcription sigma 70 d'*E.coli*) (C. Waldburger, T. Gardella, R. Wong, M.M. Susskind, *J. Mol. Biol.* **215**, 267 (1990) ; D.A. Siegele, J.C. Hu, W.A. Walter, C.A. Gross, *J. Mol. Biol.* 30 **206**, 591 (1989)), existe dans la région N-terminale de la T7 ARN polymérase entre les acides aminés 137 et 157 (L. Gross, W-J. Chen, W.T. McAllister, *J. Mol. Biol.* **228**, 1 (1992)). D'autre part, bien qu'aucune fonction n'ait pu lui être attribuée, la région 230 à 250 présente des homologies de séquence avec le régulateur  $\lambda$  de *E.coli* (McGraw, N.J., Bailey, J.N., Cleaves, G.R., 35

Dembinski, D.R., Gocke, C.R., Joliffe, L.K., MacWright, R.S. and McAllister, W.T. *Nucleic Acids Res.* **13**, 6753 (1985)).

Le domaine catalytique consiste en une poche résultant de la mise à proximité de plusieurs régions dispersées sur la structure primaire (R. Sousa, Y.J. Chung, J.P. Rose, B.-C. Wang, *Nature* **364**, 593 (1993), W.T. McAllister, C.A. Raskin, *Molec. Microbiol.* **10**, 1 (1993) ; D. Moras, *Nature* **364**, 572 (1993)). Cette poche contient notamment plusieurs motifs conservés parmi lesquels les motifs A et C sont les mieux conservés chez les polymérases (Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. and Tordo, N. *EMBO J.* **8**, 3867 (1989) ; Delarue, M., Poch, O., Tordó, N. and Moras, D. *Protein Engineering* **3**, 461 (1990) ; W.T. McAllister, C.A. Raskin, *Molec. Microbiol.* **10**, 1 (1993)). Un troisième motif, le motif B, est conservé chez les ARN et ADN polymérases ADN dépendantes, tandis qu'un motif B' différent (aussi bien pour la séquence que pour la structure apparente) existe chez les ARN et ADN polymérases ARN dépendantes (Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M. and Tordo, N. *EMBO J.* **8**, 3867 (1989) ; Delarue, M., Poch, O., Tordo, N. and Moras, D. *Protein Engineering* **3**, 461 (1990) ; L.A. Kohlstaedt, J. Wang, J.M. Friedman, P.A. Rice, T.A. Steitz, *Science* **256**, 1783 (1992) ; W.T. McAllister, C.A. Raskin, *Molec. Microbiol.* **10**, 1 (1993)).

L'un des aspects de la présente invention repose sur la découverte que certaines ARN polymérases ADN-dépendantes mutées sont capables de transcrire un ARN simple brin ou double brin en présence d'un promoteur ADN bicaténaire. De plus, ces enzymes mutantes sont peu capables ou incapables de transcrire de l'ADN simple ou double brin en présence d'un promoteur ADN bicaténaire. Elles sont donc préférentiellement ou strictement ARN-dépendantes. Leur utilisation est particulièrement intéressante dans les cas où l'on souhaite transcrire sélectivement l'ARN, en particulier lorsque l'échantillon biologique de départ contient ou risque de contenir de l'ADN ayant une séquence identique ou semblable à celle de l'ARN à amplifier.

L'invention a donc pour objet une ARN polymérase capable de transcrire un segment polynucléotidique d'intérêt de séquence quelconque contenu dans une matrice polynucléotidique, en synthé-

tisant, en présence de ladite matrice, et sous la dépendance d'un promoteur, un produit de transcription contenant une séquence d'ARN complémentaire de la séquence dudit segment polynucléotidique d'intérêt, caractérisée par le fait qu'elle est capable de 5 synthétiser ledit produit de transcription avec un meilleur rendement lorsque ladite séquence d'intérêt contenue dans la matrice est constituée d'ARN que lorsque ladite séquence d'intérêt contenue dans la matrice est constituée d'ADN.

10 L'invention concerne en particulier une ARN polymérase définie comme ci-dessus telle que le rapport du rendement en produit de transcription d'une matrice ADN au rendement en produit de transcription d'une matrice ARN, exprimé en %, est inférieur à 95 %, notamment inférieur à 85 % et en particulier inférieur à 70 %.

15 L'invention a notamment pour objet une ARN polymérase telle que définie ci-dessus, caractérisée par le fait que le rapport du rendement en produit de transcription de la matrice ARN au rendement en produit de transcription de la matrice ADN est au moins égal à 2, et en particulier au moins égal à 10.

20 Le "rendement" de la transcription est le rapport molaire de la quantité de produit de transcription à la quantité de matrice polynucléotidique présente à l'origine. Ce rendement peut être facilement déterminé par l'expérience, en introduisant dans le milieu réactionnel une quantité déterminée de la matrice polynucléotidique. Pour la comparaison des rendements obtenus avec 25 une matrice d'ADN et une matrice d'ARN, il faut évidemment que les conditions autres que celles de la nature de la matrice soient comparables.

30 L'ARN polymérase de l'invention est capable de transcrire une matrice polyribonucléotidique de séquence quelconque, et elle 35 se distingue en cela de la Q $\beta$ -réplique. Elle transcrit préférentiellement ou exclusivement une matrice d'ARN, et elle se distingue en cela des ARN polymérases ADN-dépendantes de phages continues.

35 Les ARN polymérases de l'invention, contrairement aux ARNp ARNd naturelles connues, sont notamment des ARN polymérases

capables de fonctionner sans cofacteur(s) protéique(s) associé(s). Elles peuvent toutefois se présenter sous la forme de multimères, et en particulier de dimères.

5 Les ARN polymérases mutées de l'invention sont donc généralement obtenues au départ d'ARN polymérases elles-mêmes capables de fonctionner sans cofacteurs protéiques.

10 Les ARN polymérases de l'invention peuvent être notamment des ARN polymérases dérivant par mutation d'une ARN polymérase ADN-dépendante de virus ou de phage, et en particulier d'une ADN polymérase d'un phage de *E.coli*. Parmi les phages de *E.coli*, on peut citer notamment T3, T7 et SP6.

15 Une ARN polymérase selon l'invention peut posséder une homologie de séquence protéique supérieure à 50 %, et en particulier supérieure à 80 % avec une ARN polymérase de type sauvage de la famille des ARN polymérases ADN-dépendantes incluant la T7 ARN polymérase, la T3 ARN polymérase et la SP6 ARN polymérase.

20 La famille d'ARN polymérases ADN-dépendantes mentionnée ci-dessus est connue ; voir par exemple l'article de R. Sousa, TIBS 21, 186-190 (1996), et les références citées dans cet article.

25 Parmi les polymérases de l'invention on citera en particulier celles qui contiennent au moins une mutation dans une région correspondant à la séquence d'acides aminés 625-652 de la T7 ARN polymérase, et notamment celles qui ont la composition d'une ARN polymérase ADN-dépendante de type sauvage, à l'exception du fait qu'elles comportent au moins une mutation dans ladite région. On entend ici par "mutation" le remplacement, la délétion ou l'insertion d'un acide aminé.

30 On citera par exemple les ARN polymérases comportant au moins une mutation en une position correspondant à l'une des positions 627, 628, 631, 632 et 639 de la séquence d'acides aminés de la T7 ARN polymérase ; en particulier ladite mutation peut comprendre le remplacement d'un résidu d'acide aminé, choisi parmi l'arginine, la lysine, la sérine et la tyrosine, de l'ARN polymérase de type sauvage par un autre résidu d'acide aminé. L'acide aminé remplacé est par exemple une arginine ou une lysine. L'acide aminé de remplacement peut être notamment choisi

parmi l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la glycine, la thréonine ou la sérine. On comprend que l'expression "acide aminé" désigne ici, par abus de langage, un résidu d'acide aminé engagé dans une liaison peptidique.

5 On a fait référence ci-dessus à la séquence peptidique de la T7 ARN polymérase. La numérotation des résidus d'acides aminés adoptée ici est celle décrite par Dunn, J. J. et Studier, F. W. J. Mol. Biol. 148(4), 303-330 (1981), et par Stahl, S. J. et Zinn, K., J. Mol. Biol. 148(4), 481-485 (1981).

10 L'invention concerne également :

- un gène codant pour une ARN polymérase telle que définie précédemment ; un tel gène peut être obtenu par exemple selon une méthode analogue à celle décrite ci-après dans la partie expérimentale ;

15 - un vecteur d'expression dans lequel est inséré un tel gène, ledit vecteur étant capable d'exprimer ladite ARN polymérase dans une cellule-hôte ; ce vecteur peut être obtenu de façon connue en soi ;

- une cellule-hôte contenant un tel vecteur.

20 L'invention concerne également un procédé d'obtention d'une ARN polymérase telle que définie précédemment, caractérisé par le fait : a) que l'on obtient de façon connue un gène codant pour une ARN polymérase de type sauvage, b) que l'on effectue au moins une mutation sur ledit gène, c) que l'on insère le gène muté obtenu dans un vecteur d'expression, d) que l'on fait s'exprimer ledit vecteur dans une cellule-hôte pour obtenir une ARN polymérase mutée et e) que l'on sélectionne parmi les ARN polymérases mutées obtenues celles qui présentent l'une au moins des propriétés d'une ARN polymérase telle que définie ci-dessus.

25 30 On va donner ci-après une description plus détaillée d'un mode d'exécution particulier du procédé de l'invention, dans le cas de l'utilisation de la T7 ARN polymérase comme produit de départ.

On a préparé un gène modulaire de la T7 ARNpADNd, ce gène résultant de l'assemblage de différentes cassettes (voir l'exemple 1 et la figure 1).

Le gène modulaire ainsi défini est caractérisé par le fait qu'il contient 10 cassettes bordées par des sites de restriction uniques dans le vecteur de clonage.

En particulier, ces cassettes, bordées par des sites de restriction uniques, sont caractérisées par le fait que chaque cassette comprend une région d'intérêt, notamment celles impliquées dans la reconnaissance de promoteur (région présentant une homologie avec le facteur  $\sigma$  d'*E.coli* ; région présentant une homologie avec le répresseur  $\lambda$  d'*E.coli* ; région conférant la spécificité de promoteur) et celles impliquées dans le site catalytique (motif A ; motif B ; motif C).

Pour la définition des motifs A, B et C, voir par exemple R. Sousa, TIBS 21, 186-190 (1996).

Ces cassettes, dérivées du gène *l* de la T7 ARNpADNd, ont été obtenues à l'aide de techniques de biologie moléculaire conventionnelles (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, et al, *Current Protocols in Molecular Biology* (Current Protocols, 1993)), notamment la PCR, qui a permis d'introduire des sites de restriction par mutagénèse dirigée silencieuse, et le sous-clonage dans un vecteur de clonage.

Le gène modulaire ainsi obtenu est caractérisé par la présence de sites de restrictions bordant les cassettes, ces sites de restriction étant le site Nco I (-2,+4), Bcl I (218,223), Hind III (539,544), SacI (776,781), PstI (1587, 1592), BglII (1811, 1816), NdeI (1865, 1870), XhoI (1951,1956), ClaI (2305, 2310), SalI (2497, 2502), XbaI (2660, 2665) ; la position 1, en acides nucléiques, correspond à l'adénine du codon ATG initiateur et la position 2652 à la troisième base du codon terminateur TAA. Le site NdeI (2504, 2509) a été détruit. Toutes les mutations induisant ces sites de restriction sont silencieuses, excepté la mutation générant le site NcoI qui induit le remplacement de l'asparagine en position +2 par une glycine. La position 1, en acides aminés, correspond à la première méthionine, la position 883 correspond à l'alanine carboxy-terminale.

Le gène modulaire, cloné dans un vecteur de clonage pGNEX dérivé du pGEM-1 dans lequel le polylinker a été remplacé par un

adaptateur contenant les sites de restriction Nco I, EcoRI, XbaI, constitue le support de base des mutagénèses ultérieures. Ceci est rendu possible par le fait que chaque cassette contenant une région d'intérêt est bordée par des sites de restriction uniques 5 dans le vecteur de clonage.

L'introduction de mutations non silencieuses, à l'aide de techniques de PCR, dans une ou plusieurs cassettes du gène modulaire précédemment défini, a conduit à des gènes codant pour des polymérases présentant une séquence en acides aminés qui diffère 10 d'au moins un acide aminé par rapport à la T7 exprimée à partir du gène modulaire. On a préparé en particulier des gènes mutants qui codent pour au moins un acide aminé modifié dans le motif B qui codent pour l'enzyme sauvage, par exemple avec une alanine (A) à la place d'une arginine (R) en position 627 et/ou une alanine (A) à la 15 place d'une sérine (S) en position 628 et/ou une alanine (A) à la place d'une lysine (K) en position 631 et/ou une alanine (A) à la place d'une arginine (R) en position 632 et/ou une alanine (A) à la place d'une tyrosine (Y) en position 639.

On a également obtenu des gènes mutants qui codent pour 20 une polymérase dont la région 625VTRS VTKRS VMT LAYGSKEFGFRQQVLD652 comprenant le motif B a été remplacée en tout ou partie par la région homologue B' présente chez certaines polymérases ARN dépendantes, notamment celles des polymérases du virus de l'hépatite C (NCGYRRCRASGVLTTS CGNTLTCYI), et de l'intégrase 32 de levure (HNTTLGIPQGSVVSPILCNIFLDKL).

Les gènes précédemment décrits ont été clonés dans un vecteur pMR résultant de la ligation du fragment SspI du pMal-c (Biolabs) contenant notamment le répresseur lacI<sup>q</sup>, et du fragment SspI du pMH (V. Cheynet, B. Verrier, F. Mallet, *Protein expression and purification* 4, 367 (1993)) contenant un minicistron 30 permettant d'atteindre un haut niveau d'expression, ainsi qu'une séquence codant pour une queue poly-histidine fusionnée à l'extrémité terminale du gène cloné (exemple 1, figure 2). L'expression des protéines recombinantes T7 ARNp dans la souche bactérienne BL21 représente jusqu'à 30 % des protéines totales de la bactéries. Les protéines solubilisées dans un tampon désoxycholate

contenant une forte concentration saline sont déposées sur une colonne TALON (Clontech) permettant la purification spécifique par chélation avec l'ion de protéines présentant une queue poly-histidine. 130 à 2200 µg de polymérases sont ainsi obtenus pour 5 20 ml de culture, avec une pureté supérieure à 95 % comme indiqué (i) par une coloration au bleu de Coomassie (exemple 1, figure 3), (ii) par une analyse en Western-blot avec un anticorps poly-clonal de cobaye anti-T7 RNAP (bioMérieux) et un anticorps monoclonal de souris (Quiagen) anti-MRGSHHHHHH, (iii) par l'absence 10 d'activité endonucléase, exonucléase simple brin et double brin, ribonucléase, comme déterminé essentiellement selon la méthode de He et al (B. A. He, M. Rong, D. L. Lyakhov, H. Gartenstein, G. Diaz, et al, *Protein Expr Purif* 9, 142 (1997)). Ce résultat reflète les performances du couple hôte-vecteur pMR-BL21 et du procédé de purification vis-à-vis de la queue MRGSHHHHHSVLE. 15

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une ARN polymérase telle que définie précédemment, dans un procédé de transcription d'un segment polynucléotidique d'intérêt ayant une séquence quelconque, ledit segment, de type ARN, étant contenu 20 dans une matrice polynucléotidique, en vue de synthétiser, en présence de ladite matrice, un produit de transcription contenant une séquence d'ARN complémentaire de la séquence dudit segment polynucléotidique d'intérêt.

Selon un mode d'exécution particulier, ladite utilisation 25 est caractérisée par le fait que ladite matrice polynucléotidique comprend, en amont dudit segment polynucléotidique d'intérêt, un promoteur reconnu par ladite ARN polymérase, et que ledit produit de transcription est un ARN complémentaire d'une séquence de la matrice commençant en un site d'initiation de la transcription 30 pour ledit promoteur.

Les ARN polymérases de l'invention peuvent être utilisées notamment en vue de réaliser (i) une amplification de cible ARN de façon isotherme, (ii) un séquençage direct d'ARN et (iii) la synthèse d'ARN d'intérêt particulier (par exemple des sondes, des 35 ribozymes, etc.). En outre, des ARN polymérases de l'invention sont capables d'incorporer des bases modifiées dans le brin néo-

synthétisé, ce qui facilite notamment la quantification ou l'utilisation dudit brin.

L'invention concerne notamment l'utilisation de ces enzymes recombinantes ainsi exprimées et purifiées dans une méthode 5 de synthèse d'ARN à partir d'une matrice ARN, sous la dépendance d'un promoteur.

Les enzymes ainsi purifiées ont été évaluées, dans un contexte promoteur-dépendant, sur différentes matrices (exemple 10 2, figure 4 d'une part, et exemple 3, figure 6, d'autre part) en particulier une matrice comportant un ARN simple brin. Il a été montré qu'une polymérase mutée obtenue selon l'invention était 15 capable de générer un transcrit spécifique de la bonne taille notamment sur matrice ARN simple brin. Dans l'exemple 2, il est indiqué que l'enzyme sauvage identiquement produite ne semble pas pouvoir réaliser ce phénomène. Toutefois, l'exemple 3 montre que 20 l'enzyme sauvage possède en fait la propriété de transcrire une matrice d'ARN. Ces résultats apparemment divergents s'expliquent par le fait que les conditions expérimentales, dans ces deux exemples sont différentes. En effet, dans l'exemple 2, la présence 25 du transcrit est mise en évidence par la technique d'incorporation d'un UTP, marqué au phosphore radioactif, tandis que dans l'exemple 3 la technique utilisée est le Northern Blot pour les matrices du groupe 2, et dans ce dernier cas, la détection du transcrit par la technique Northern Blot est 40 fois plus sensible que la détection par incorporation de phosphore radioactif. 30 L'exemple 2 ci-après montre donc qu'une polymérase mutée obtenue selon l'invention est capable de générer un transcrit spécifique de la bonne taille sur matrice ARN simple brin, et l'exemple 3 montre qu'en fait la polymérase sauvage correspondante est capable de générer un transcrit spécifique de la bonne taille sur des matrices ARN indépendamment de leur séquence.

De plus, une telle polymérase mutée est incapable, contrairement à la polymérase sauvage, de générer un transcrit de bonne taille sur matrice ADN simple brin ou double brin. Si on 35 remplace l'ion  $Mg^{2+}$  présent dans le milieu réactionnel par l'ion  $Mn^{2+}$ , l'enzyme mutée, sur matrice ARN simple brin, ne génère pas dans ces conditions de transcrit spécifique de la bonne taille,

mais est cependant capable de générer de grandes quantités de produits abortifs. Une telle polymérase mutée est en outre capable de déplacer un hybride ARN/ARN.

Dans les dessins annexés :

5 - la figure 1 illustre la stratégie d'amplification, décrite en détail à l'exemple 1 ci-après, pour la construction d'un gène modulaire de la T7 ARN polymérase,

10 - la figure 2 illustre la structure du vecteur d'expression pMR contenant ce gène modulaire,

15 - la figure 3 représente des profils d'électrophorèse des protéines exprimées à l'aide de ce vecteur, comme décrit en détail à l'exemple 1 ci-après,

- la figure 4 représente schématiquement les systèmes matriciels utilisés dans les essais de transcription de l'exemple 2 ci-après,

20 - la figure 5 représente les profils d'electrophorèse des produits de transcription obtenus à l'exemple 2 ci-après, et

- la figure 6 représente schématiquement les systèmes matriciels utilisés dans les essais de transcription de l'exemple 3 ci-après.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

#### EXEMPLES

25 **Exemple 1 :** Construction du gène de la T7 ARN polymérase sous forme modulaire ; expression et purification de la T7 ARN polymérase.

Le gène de la T7 ARN polymérase a été construit sous forme modulaire, en tenant compte des régions d'homologie avec les autres polymérases ainsi que des fonctions associées à certains domaines de la T7 ARN polymérase. Il a été divisé en 10 régions ou cassettes (Figure 1-A), chaque région étant délimitée par des sites de restriction uniques dans le vecteur de clonage. Six cassettes sont caractéristiques en ce qu'elles contiennent respectivement un domaine ayant une similarité avec une partie du facteur sigma d'*E.coli*, un domaine ayant une homologie avec le

répresseur lambda d'*E.coli*, un domaine impliqué dans la spécificité de promoteur des polymérases phagiques, les motifs A et C conservés chez les polymérases matrices dépendantes et le motif B conservé chez les polymérases ADN-dépendantes. Chaque région est amplifiée par PCR (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, et al, *Current Protocols in Molecular Biology* (Current Protocols, 1993)) (Figure 1a-B1) à partir du gène sauvage (gène 1) en utilisant des amorces définies comme suit : (i) ces amorces contiennent des mutations silencieuses permettant l'introduction de sites de restriction délimitant les cassettes ; (ii) l'amorce située en position 3' d'une région et l'amorce située en position 5' de la région contiguë sont partiellement chevauchantes. Les produits d'amplification contigus sont mélangés et réamplifiés en utilisant les amorces externes (Figure 1a-B1). Les 5 fragments générés sont clonés dans le vecteur PCRII (Invitrogen) (Figure 1-B2). A partir des 5 fragments clonés, le gène de la T7 ARN polymérase est reconstruit de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', par des sous-clonages successifs dans le vecteur de clonage pGNEX (Figure 1-B3). Ce vecteur est dérivé du plasmide pGEM-1 (Promega) dans lequel le polylinker est remplacé par un adaptateur contenant les sites de restriction NcoI-EcoRI-XbaI. Le gène modulaire de la T7 ARN polymérase (T7 ARN pol) ainsi obtenu contient 17 sites uniques de clonage dans le pGNEX dont 11 sites nouvellement introduits (Figure 1-C). Ce gène est ensuite sous-cloné dans le vecteur d'expression pMR (Figure 2). Ce vecteur, dérivé du vecteur pMH (V. Cheynet, B. Verrier, F. Mallet, *Protein expression and purification* 4, 367 (1993)), contient le promoteur fort tac régulé par IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), un court minicistron entouré de 2 sites de liaison des ribosomes constituant un contexte efficace pour l'initiation de la traduction et une queue polyhistidine fusionnée à l'extrémité N-terminale de la protéine exprimée permettant sa purification par chromatographie d'affinité pour un ion métallique. Le gène codant pour le répresseur lacI<sup>Q</sup> permettant un meilleur contrôle de l'expression est également présent dans pMR. Ce vecteur d'expression est transformé selon les méthodes classi-

ques (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, et al, *Current Protocols in Molecular Biology* (Current Protocols, 1993)) dans la souche bactérienne *E.coli* BL21. Une préculture est utilisée pour inoculer 30 ml de milieu de culture.

5 L'expression des protéines est induite par IPTG pendant 4 h à 37°C dès que la densité optique à 600 nm de la culture atteint 0,6. La T7 ARN pol ainsi exprimée représente 30 % des protéines bactériennes totales (Figure 3). Elle est ensuite extraite des bactéries par lyse (sonication) en présence d'un détergent. A 10 partir de la fraction d'extraction soluble, la T7 ARN pol est purifiée par chromatographie d'affinité pour l'ion  $Co^{2+}$  et éluée par un gradient d'imidazole. Elle est analysée sur un gel SDS-PAGE et visualisée par coloration au bleu de Coomassie (Figure 3). L'absence de produits de dégradation est vérifiée par Western 15 Blot avec un anticorps polyclonal anti T7 ARN pol produit chez le cobaye et un anticorps monoclonal anti MRGSH6 commercial (Qia- gen). L'absence d'activités parasites endonucléase, exonucléases et RNase est vérifiée selon le protocole décrit par He et al, *Protein Expr Purif 9*, 142 (1997)). A partir de 20 ml de culture, 20 700 à 800  $\mu$ g d'enzymes, de pureté supérieure à 95 %, sont obtenus de manière reproductible. Le rendement de purification est de 75 %.

Les mutations ponctuelles sont créées par PCR séquentielle (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, et al, *Current Protocols in Molecular Biology* (Current Protocols, 1993)) (ou double PCR), de la même façon qu'avaient été introduits les sites de restriction: les amorces internes contiennent la mutation à introduire ; les amorces externes encadrent la région à muter et contiennent les sites de restriction délimitant cette région dans le gène modulaire. Cette cassette ainsi mutée est ensuite clonée dans le gène modulaire. Des oligonucléotides synthétiques peuvent également remplacer une cassette complète.

Légende des figures mentionnées à l'exemple 1 :

**Figure 1** : illustre la stratégie d'amplification pour la construction du gène modulaire de la T7 ARN polymérase. **(A)** : Vision du gène de la T7 ARN polymérase (flèches verticales) par rapport aux régions d'intérêt. Les régions notées de 1 à 6 sont : 1, homologie avec une partie du facteur sigma d'*E.coli* ; 2, homologie avec le répresseur lambda d'*E.coli* ; 3, motif A ; 4, motif B ; 5, spécificité de promoteur des polymérases phagiques ; 6, motif C. **(B)** : (1) Position des amorces contenant les mutations silencieuses pour la création des sites de restriction (□) ; Nc, NcoI ; Bc, BclI ; H, HindIII ; Sc, SacI ; P, PstI ; Bg, BglII ; Nd, NdeI ; Xo, XhoI ; C, ClaI ; S1, SalI ; Xb, XbaI. L'extension par PCR chevauchante conduit à 5 fragments contenant 3 sites de restriction (F1 à F5). Sub-cloning signifie : sous-clonage. (2) Chaque fragment ainsi généré (F1 à F5) est cloné dans le vecteur pCRII. E, EcoRI. (3) Reconstruction du gène modulaire de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', en utilisant à chaque étape le site de restriction commun à 2 fragments et le site de restriction EcoRI du vecteur pCRII et du vecteur de clonage pGNEX ; le site de restriction XbaI commun au dernier fragment et au vecteur pGNEX est utilisé pour le dernier sous-clonage. **(C)** Structure du gène modulaire de la T7 ARN polymérase et position des sites de restriction uniques dans le vecteur pGNEX déjà existants (en bas) et créés par mutagénèse (en haut).

**Figure 2** : illustre la structure du vecteur d'expression pMR contenant le gène modulaire de la T7 ARN polymérase. Ptac : promoteur tac (boîte noire) ; RBS1-MC-RBS2, minicistron entouré de 2 sites de liaison des ribosomes (flèche blanche) ; (His)6T7RNAPcas, gène modulaire de la T7 ARN polymérase (flèche grise) ; rrnB T1 T2, terminateurs de transcription forts (boîte avec pointillés) ; bla, gène de résistance à l'ampicilline (flèche noire) ; pMB1 ori/M132 ori-, origines de réPLICATION (fine boîte blanche) ; lacI<sup>Q</sup>, gène codant pour le répresseur lacI<sup>Q</sup>.

(flèche rayée) ; certains sites de restriction sont indiqués, dont les nouveaux sites introduits par mutagénèse (soulignés).

**Figure 3** : montre les profils électrophorétiques obtenus permettant l'analyse de l'expression et de la purification de la T7 ARN polymérase. Les lysats bactériens sont préparés à partir de 1ml prélevés dans 30 ml de culture pour contrôler l'expression de la T7 ARN polymérase en présence (+) ou absence (-) d'IPTG. La T7 ARN polymérase est extraite à partir de 20 ml de la même culture. La fraction soluble est chargée sur la colonne de purification (piste L) et la T7 ARN polymérase est éluée (piste E) par un gradient d'imidazole. M, marqueur de poids moléculaire. Les protéines sont visualisées sur un gel 10 % SDS-PAGE par coloration au bleu de Coomassie. La flèche indique la position de la T7 ARN polymérase.

**Exemple 2 :** Transcription de matrices ARN et ADN par la T7 ARN polymérase mutée R627A sous la dépendance d'un promoteur

Les systèmes matriciels utilisés dans cet exemple sont présentés schématiquement figure 4. Le système de transcription ADN simple brin comprend un brin matrice (a) de 50 bases de séquence 3'ATTATGCTGAGTGATATCCCAACCGCGTCACAAGTGAGTACCAATACCG5' et hybridé des positions -17 à +1 au brin promoteur non-matrice (b) de séquence 5'TAATACGACTCACTATAG 3' (bloqué à son extrémité 3'). Le système de transcription ADN double brin comprend le brin matrice (a) hybridé au brin non matrice (c) de séquence 5'TAATACGACTCACTATAGGGTTGGCGCAGTGTTCACTCATGGTTATGGC3'.

Le système de transcription ARN simple brin est formé d'un brin hybride ADN des positions -17 à -1 et ARN des positions +1 à +33 de séquence

3'ATTATGCTGAGTGATATCCCAACCGCGUCACAAGUGAGUACCAUACCG5', hybridé au brin promoteur non-matrice (b). Les transcrits complets attendus sur les trois systèmes sont de 33 bases.

Les réactions sont faites dans 20  $\mu$ l d'un tampon dérivé de celui décrit par J. F. Milligan, D. R. Groebe, G. W. Witthell, O. C. Uhlenbeck, Nucleic Acids Res. 25, 8783 (1987), a sa-

voir Tris-HCl 40 mM, pH 8,1, spermidine 1mM, PEG 8 % (g/V), triton 0,01 % (V/V), BSA 5 µg/100 µl, 1 µl (40 u) de RNAGuard porcine (Pharmacia Biotech), UTP 12,5 µM, a 32P UTP 0,5 µCi (Amersham, 10 mCi/ml 400Ci/mmol) 0,4 mM des trois ribonucléosides triphosphate A, G, C, Mg(OAc)<sub>2</sub> 6 mM. La concentration en matrice est fixée à 10<sup>11</sup> copies de chaque brin dans 20 µl de réaction. La T7 ARN polymérase sauvage est utilisée à 0,5 µM (100 ng / 20 µl), la T7 ARN polymérase mutée R627A à 3,65 µM (730 ng / 20 µl). Avant d'ajouter les enzymes, les réactions sont dénaturées 5 minutes à 65°C dans un bloc chauffant puis ramenées progressivement à 37°C. Les réactions sont initiées par l'ajout des polymérasés, incubées 1 heure à 37°C puis stoppées par ajout d'un volume égal de bleu formamide 2x (formamide 90 %, EDTA 25 mM, xylène cyanol 0,02 %, bleu de bromophénol 0,02 %) et dénaturées 5 minutes à 95°C. 20 µl de chaque réaction sont déposés sur gel dénaturant (20 % acrylamide, urée 7 M, TBE 1X), puis après migration le gel est autoradiographié à -70°C sur film Biomax MR (Kodak). Les résultats (profils d'électrophorèse) sont présentés figure 5, et en particulier les résultats de transcription obtenus avec la T7 ARN polymérase mutée R627A (puits 1-3) et la T7 ARN polymérase sauvage (puits 4-6), sur les matrices ARN simple brin (puits 1 et 4), ADN double brin (puits 2 et 5), et ADN simple brin (puits 3 et 6). La transcription sur ARN simple brin, détectée par la détection d'un transcrit complet de 33 bases, est possible en utilisant la T7 ARN polymérase mutée R627A (puits 1) et non l'enzyme sauvage (puits 4) qui produit par contre de nombreux transcrits abortifs ; voir cependant les résultats différents obtenus à l'exemple 3 ci-après. La T7 ARN polymérase mutée R627A présente une activité de transcription résiduelle sur ADN double brin (puits 2), caractérisée par la présence d'un transcrit majoritaire de taille inférieure au transcrit attendu, et la présence en faible quantité de produits abortifs. Sur ADN simple brin (puits 3), ce transcrit de taille anormale disparaît, alors que la quantité de produits abortifs augmente. Au contraire, l'enzyme sauvage permet l'obtention de transcrits spécifiques en présence de matrices ADN (puits 5 et 6), cette enzyme présentant par ailleurs une meilleure activité de transcription sur la matrice

ADN double brin (puits 5) que sur la matrice ADN simple brin (puits 6) ; pour ces deux matrices, l'enzyme sauvage induit la synthèse de nombreux transcrits abortifs. Ces résultats montrent que le remplacement de l'arginine 627 par une alanine confère à l'enzyme mutante la possibilité de synthétiser de l'ARN à partir d'une matrice ARN et induit la perte de capacité à synthétiser de l'ARN à partir d'une matrice ADN.

Exemple 3 :

10 On purifie la T7 ARN polymérase obtenue comme à l'exemple 1 par chromatographie d'affinité selon la méthode décrite par Arnaud N. et al., *Gene*, 199, 149-156 (1997).

La T7 ARN polymérase purifiée a une activité spécifique d'environ 200 U/µg.

15 Les séquences des matrices utilisées pour la transcription sont décrites dans le tableau 1 ci-après.

Dans les essais décrits ci-dessous, les matrices de séquence 1, 2 et 3 du tableau 1 sont appelées matrices du groupe 1, du groupe 2 et du groupe 3, respectivement.

20 La séquence des sondes utilisées est représentée dans le tableau 1 (séquences n° 4 et 5).

La séquence n° 4 reconnaît l'extrémité 3' des produits de transcription obtenus avec les matrices des groupes 1 et 3, et la séquence n° 5 reconnaît l'extrémité 3' des produits de transcription de la matrice du groupe 2.

25 Les sondes sont marquées avec un  $\gamma^{32}\text{P}$  ATP par la T4 poly-nucléotide kinase ou avec un  $\alpha^{32}\text{P}$  ddATP par une désoxynucléotide terminal transferase.

Essais de transcription

30 Les réactions sont effectuées dans un volume de 20 µL contenant 40 mM Tris- HCl, 1mM spermidine 50 µg/ml d'albumine sérique bovine, 0,01 % (v/v) Triton X100, 80 mg/ml PEG 8000, 1 µL RNAGuard (Pharmacia), 6 mM acétate de magnésium,  $10^{11}$  copies des brins matrice et non matrice, les nucléosides triphosphates nécessaires à la transcription et les nucléosides triphosphates marqués comme indiqué. Lorsque le nucléoside triphosphate marqué

est le  $\alpha^{32}\text{P}$  ATP, on utilise des concentrations de 0,4 mM UTP, CTP et GTP, 12,5  $\mu\text{M}$  ATP et 0,5  $\mu\text{Ci}$   $\alpha^{32}\text{P}$  ATP (New England Nuclear-Dupont, 800 Ci/mmol). Lorsque le nucléoside triphosphate marqué est le  $\alpha^{32}\text{P}$  UTP, on utilise des concentrations de 0,4 mM ATP, CTP et GTP, 12,5  $\mu\text{M}$  d'ATP et 0,5  $\mu\text{Ci}$   $\alpha^{32}\text{P}$  UTP (Amersham, 400 Ci/mmol). Lorsque le nucléoside triphosphate marqué est le  $\gamma^{32}\text{P}$  GTP, on utilise des concentrations de 0,4 mM ATP, UTP, CTP et GTP, et 20  $\mu\text{Ci}$   $\gamma^{32}\text{P}$  GTP (Amersham, 5000 Ci/mmol).

Les échantillons sont chauffés pendant 5 minutes à 70°C puis refroidis lentement jusqu'à 37°C pour permettre l'hybridation des brins matrice et non matrice. On ajoute ensuite 260 ng de T7 ARN polymérase et on laisse incuber pendant 1 heure à 37°C. On arrête les réactions en ajoutant un égal volume de tampon 2X (90 % formamide, 25 mM EDTA, 0,02 % xylène cyanol, 0,02 % bleu de bromophénol). Les produits de transcription sont analysés par électrophorèse, après chauffage pendant 5 minutes à 95°C, sur un gel dénaturant à 20 % de polyacrylamide, et examinés par autoradiographie.

Pour l'analyse Northern Blot, on effectue les réactions dans les mêmes conditions, mais sans les nucléotides marqués. Les échantillons, après migration sur un gel dénaturant à 20 % de polyacrylamide, sont transférés sur membrane de nylon (Appligene) et les produits de transcription sont détectés par la sonde marquée appropriée et sont examinés par autoradiographie.

25

#### Définition de matrices synthétiques courtes

Trois types de matrices synthétiques courtes, contenant un promoteur ADN bicaténaire, ont été définis afin de vérifier si la T7 ARN polymérase est capable d'utiliser une matrice d'ARN dans une réaction de transcription.

Le premier type de matrices (ARN+18) a été défini afin d'étudier la capacité de la T7 ARN polymérase à transcrire une matrice ARN durant la phase dite processive. Ce premier type de matrice comprend un promoteur bicaténaire suivi en aval par une

séquence chimère ADN-ARN dont la transition est située 18 bases en aval du site d'initiation de la transcription.

Le second type de matrices (ARN+1) a été défini afin d'étudier la capacité de la T7 ARN polymérase à transcrire une matrice ARN durant la phase de début de transcription. Ce second type de matrices comprend un promoteur bicaténaire suivi d'une séquence d'ARN.

Le troisième type de matrices (ADN), qui sert de comparaison, comprend un promoteur bicaténaire suivi en aval d'une séquence d'ADN.

Afin d'étudier l'influence du brin non matrice, les matrices ADN, ARN+18 et ARN+1 peuvent être soit monocaténaires (m), soit des hétéroduplex bicaténaires (bhe), soit encore des homoduplex bicaténaires (bho). La matrice homoduplex bicaténaire ARN+18 forme un duplex ARN-ARN à partir de la position +18. De même la matrice homoduplex bicaténaire ARN+1 forme un duplex ARN-ARN à partir du site de début de la transcription.

Il convient de noter que dans le tableau 1, on a représenté les différents nucléotides avec les lettres A, T, C, G. Lorsque la matrice, ou une partie de la matrice, est de l'ADN, ces lettres représentent des désoxyribonucléotides. Lorsque la matrice, ou une partie de la matrice, est en ARN, ces lettres représentent des ribonucléotides et il faut comprendre que le symbole T est alors utilisé en remplacement du symbole U.

Les différents systèmes de transcription qui viennent d'être évoqués sont représentés schématiquement dans la figure 6 annexée dans laquelle, pour chaque système bicaténaire, le brin supérieur est le brin non matrice et le brin inférieur est le brin matrice. La région promotrice double brin ADN est représentée par un trait épais. Les brins ADN sont représentés par un trait fin, les brins ARN sont représentés par un trait interrompu. L'indication +1 correspond au site de début de transcription. L'indication +18 correspond à la dix-huitième base en aval du site de début de la transcription. Dans la désignation de ces différents systèmes de transcription, la lettre m signifie monocaténaire ; la lettre b signifie bicaténaire ; bhe signifie hétéroduplex bicaténaire ; et bho signifie homoduplex bicaténaire.

Les systèmes de transcription de la figure 6 ont été utilisés avec chacune des matrices, ou, selon les cas, avec certaines des matrices du tableau 1. Les matrices du groupe 1, utilisant la séquence n° 1, correspondent à une séquence promotrice d'ADN double brin suivie d'une région d'initiation +1 à +6 consensus (Dunn et Studier, *J. Mol. Biol.*, 166, 477-535, 1983) elle-même suivie d'une séquence de vingt six bases en aval.

Les matrices du groupe 2 correspondent à une séquence promotrice ADN double brin suivie d'une séquence non favorable, puisqu'elle peut permettre la terminaison précoce de la transcription (Martin et al., *Biochemistry*, 27, 3966-3974, 1988).

Les matrices du groupe 3 correspondent à la même séquence d'initiation non favorable que le groupe 2, suivie de la même séquence aval que le groupe 1.

15

### Résultats

Les résultats sont résumés dans le tableau 2 ci-joint.

On constate que la transition ADN-ARN sur la matrice ARN+18 est efficacement passée par le complexe d'elongation, comme le montre l'absence d'accroissement de terminaisons précoce autour de la position +18, par rapport au témoin ADN.

La T7 ARN polymérase est capable d'initiation de la transcription sur différentes matrices d'ARN et est capable de transcrire entièrement ces matrices. La détection de transcrits ayant la taille attendue, pour tous les groupes de matrices, montre que l'utilisation de la matrice ARN n'est pas dépendante de la séquence, bien que l'efficacité globale dépende de la composition en bases, comme cela est observé aussi sur les matrices ADN témoins.

30 Les résultats différents mentionnés à l'exemple 2 ci-dessus proviennent du fait que la détection par la technique Northern Blot est dans le cas présent 40 fois plus sensible que la technique de détection utilisée à l'exemple 2, comme cela a été signalé ci-dessus dans la description.

35 La T7 ARN polymérase est capable de transcrire un duplex ARN-ARN. Aucun accroissement du nombre de produits de transcription abortifs n'est observé avec la matrice homoduplex ARN+1.

La transcription des matrices bicaténaires homo- ou hétéro-duplex est globalement similaire. Dans le cas des matrices ARN+18 du groupe 2, on obtient davantage de transcrits de la taille attendue avec le système homoduplex qu'avec le système hétéroduplex.

La présence du brin non matrice influence l'efficacité de la transcription. En effet, le rendement de transcription est accru sur les matrices monocaténaires, comme le montrent, d'une part, l'augmentation du nombre de transcrits de bonne taille et, d'autre part, le fait qu'un événement d'initiation soit plus fréquemment associé à la synthèse d'un transcrit complet. Cependant, avec les matrices du groupe 2, le système monocaténaire ne donne pas de meilleurs résultats.

Ainsi, la T7 ARN polymérase possède une activité transcriptionnelle sur matrice ARN, en présence d'un promoteur bicaténaire ADN. Le rendement de transcription observé n'est que 10 à 100 fois plus faible que sur matrice ADN.

TABLEAU 1

SEQUENCE N° 1 :

5

SEQUENCE N° 2 :

SEQUENCE N° 3 :

3' ATTATGCTGAGTGATATCCCAACAGATCGTCGTATTGCGAGGTTCATGT 5'  
15 +1 +18

SEQUENCE N° 4 :

20 3' ATTGCGAGGTTCATGT 5'

SEQUENCE N° 5 :

3' GTGAGTACCAATACCG 5'

25

TABLEAU 2

5

Matrice	Groupe (1)			Groupe (2)			Groupe (3)		
	TS <sup>a</sup>	EI <sup>b</sup>	Eff <sup>c</sup>	TS <sup>a</sup>	EI <sup>b</sup>	Eff <sup>c</sup>	TS <sup>a</sup>	EI <sup>b</sup>	Eff <sup>c</sup>
ADN m	240	242	1/10	192	593	1/31	149	633	1/43
ADN bho	80	152	1/18	102	191	1/19	67	893	1/133
ARN+18 m	800	650	1/8	326	1488	1/45	253	1246	1/49
ARN+18 bhe	208	309	1/14	99	647	1/65	61	642	1/106
ARN+18 bho	176	272	1/16	358	1093	1/31	nr <sup>e</sup>	nr	nr
ARN+1 m	13	141	1/108	NA <sup>f</sup>	NA	NA	NA <sup>d</sup>	NA	NA
ARN+1 bhe	3.2	61	1/227	NA <sup>d</sup>	NA	NA	NA <sup>d</sup>	NA	NA
ARN+1 bho	6.4	110	1/157	NA <sup>d</sup>	NA	NA	nr	nr	nr

Comparaison de la transcription par la polymérase T7 sur différentes matrices, par incorporation de  $\gamma^{32}\text{P}$ -GTP

10 <sup>a</sup>TS : transcrit spécifique en picomoles pour 10 picomoles de matrice

<sup>b</sup>EI : nombre d'événements d'initiation pour une copie de matrice

15 <sup>c</sup>Eff : l'efficacité correspond au nombre d'événements d'initiation conduisant à la synthèse d'un transcrit complet

<sup>d</sup>NA: non accessible (non quantifiable)

<sup>e</sup>nr: non réalisée

<sup>f</sup>NA: non accessible; cependant le transcrit complet est détecté en Northern blot

20

REVENDEICATIONS

1. Procédé d'amplification d'une séquence cible quelconque d'ARN, par transcription sous la dépendance d'un promoteur, dans un échantillon d'ARN comprenant ladite séquence cible, dans lequel on met en contact ledit échantillon :

- avec un réactif capable de s'hybrider avec ledit ARN comprenant ladite séquence cible,

10 - et avec un système enzymatique comprenant une activité d'ARN polymérase ARN-dépendante, dans des conditions permettant l'hybridation dudit réactif avec ledit ARN comprenant ladite séquence cible et dans des conditions permettant le fonctionnement de ladite activité d'ARN polymérase 15 ARN-dépendante ;

dans lequel ledit réactif contient :

20 (i) un premier brin nucléotidique comprenant : a) un premier segment nucléotidique capable de jouer le rôle de brin sens d'un promoteur pour ladite activité d'ARN polymérase et b), en aval dudit premier segment, un second segment nucléotidique comprenant une séquence capable d'hybridation avec une région dudit ARN, et

25 (ii), à l'état hybridé sur le premier brin, un second brin nucléotidique comprenant un troisième segment nucléotidique capable d'hybridation avec ledit premier segment de façon à former avec lui un promoteur double brin fonctionnel ; et dans lequel ladite activité d'ARN polymérase est capable de transcrire une matrice d'ARN, en présence dudit réactif hybridé sur ladite matrice, en l'absence de facteur protéique associé et 30 en l'absence d'une activité de ligase.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ledit troisième segment est flanqué, à son extrémité amont, par un quatrième segment nucléotidique qui est plus court que ledit second segment du premier brin.

35 3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel ledit quatrième segment est capable d'hybridation avec une partie en regard dudit second segment.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 et 3, dans lequel ledit quatrième segment dudit second brin est choisi parmi ceux dont la séquence facilite l'initiation de la transcription pour ladite ARN polymérase.

5 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, dans lequel ledit second segment dudit premier brin contient un nombre de nucléotides au moins égal à la somme du nombre de nucléotides dudit quatrième segment, s'il est présent, et du nombre de nucléotides de ladite séquence du second segment qui est capable d'hybridation avec ladite région dudit ARN.

10 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel lesdits premier et troisième segments sont constitués d'ADN.

15 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit quatrième segment est constitué d'ADN.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ladite ARN polymérase est une ARN polymérase de type sauvage de virus ou de phage.

20 9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel ladite ARN polymérase est choisie dans la famille des ARN polymérases incluant la T7 ARN polymérase, la T3 ARN polymérase et la SP6 ARN polymérase.

25 10. Procédé selon la revendication 8, dans lequel ladite ARN polymérase dérive par mutation d'une ARN polymérase choisie dans la famille des ARN polymérases incluant la T7-, la T3 et la SP6 ARN polymérases.

30 11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel ladite ARN polymérase contient au moins une mutation dans la région correspondant à la séquence d'acides aminés 625 à 652 de la T7 ARN polymérase.

35 12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel ladite ARN polymérase est capable de transcrire une séquence cible poly-nucléotidique avec un meilleur rendement lorsque ladite séquence cible est constituée d'ARN que lorsqu'elle est constituée d'ADN.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel ledit système enzymatique contient uniquement une activité d'ARN polymérase.

14. ARN polymérase utilisable dans le procédé de l'une quelconque des revendications précédentes, capable de transcrire, sous la dépendance d'un promoteur, une cible polynucléotidique d'intérêt de séquence quelconque contenue dans une matrice polynucléotidique, en synthétisant, en présence de ladite matrice et en l'absence de facteur protéique associé, un produit de transcription contenant une séquence d'ARN complémentaire de ladite séquence, ladite ARN polymérase étant capable de synthétiser ledit produit de transcription avec un meilleur rendement lorsque ladite séquence cible de ladite matrice est constituée d'ARN que lorsqu'elle est constituée d'ADN.

15. ARN polymérase selon la revendication précédente, dans laquelle le rapport du rendement en produit de transcription de la matrice ARN au rendement en produit de transcription de la matrice ADN est supérieur à 2, et en particulier supérieur à 10.

16. ARN polymérase selon l'une quelconque des revendications 14 et 15, caractérisée par le fait qu'elle dérive par mutation d'une ARN polymérase de virus ou de phage.

17. ARN polymérase selon la revendication 16, caractérisée par le fait que ledit phage est un phage de E. Coli.

18. ARN polymérase selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisée par le fait qu'elle possède une homologie de séquence protéique supérieure à 50 %, et en particulier supérieure à 80%, avec une ARN polymérase de type sauvage de la famille des ARN polymérasées ADN-dépendantes incluant la T7 ARN polymérase, la T3 ARN polymérase et la SP6 ARN polymérase.

19. ARN polymérase selon la revendication 18, caractérisée par le fait qu'elle contient au moins une mutation dans une région correspondant à la séquence d'acides aminés 625-652 de la T7 ARN polymérase.

20. ARN polymérase selon la revendication 19, caractérisée par le fait qu'elle a la composition d'une ARN polymérase ADN-dépendante de type sauvage, à l'exception du fait qu'elle comporte au moins une mutation dans ladite région.

21. ARN polymérase selon la revendication 19 ou 20, caractérisée par le fait qu'elle comporte au moins une mutation en une position correspondant à l'une des positions 627, 628, 631, 632 et 639 de la séquence d'acides aminés de la T7 ARN polymérase.

22. ARN polymérase selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, caractérisée par le fait que ladite mutation comprend le remplacement d'un résidu d'acide aminé, choisi parmi l'arginine, la lysine, la sérine et la tyrosine, de l'ARN polymérase de type sauvage, par un autre résidu d'acide aminé.

23. ARN polymérase selon la revendication 22, caractérisée par le fait que ledit acide aminé remplacé est une arginine ou une lysine et/ou par le fait que ledit autre résidu d'acide aminé est un résidu d'alanine, de valine, de leucine, d'isoleucine, de glycine, de thréonine ou de sérine.

24. ARN polymérase selon l'une quelconque des revendications 19 à 23, caractérisée par le fait que ladite mutation comprend le remplacement de tout ou partie de ladite région par une région homologue présente dans une polymérase ARN-dépendante de type sauvage.

25. Gène codant pour une ARN polymérase telle que définie dans l'une quelconque des revendications 14 à 24.

26. Vecteur d'expression dans lequel est inséré un gène tel que défini dans la revendication précédente, ledit vecteur étant capable d'exprimer ladite ARN polymérase dans une cellule-hôte.

27. Cellule-hôte contenant un vecteur d'expression tel que défini dans la revendication précédente.

28. Procédé d'obtention d'une ARN polymérase telle que définie dans l'une quelconque des revendications 14 à 24, caractérisé par le fait : a) que l'on obtient de façon connue un gène codant pour une ARN polymérase de type sauvage, b) que l'on effectue au moins une mutation sur ledit gène, c) que l'on insère le gène muté obtenu dans un vecteur d'expression, d) que l'on fait s'exprimer ledit vecteur dans une cellule-hôte pour obtenir une ARN polymérase mutée et e) que l'on sélectionne parmi les ARN polymérasées mutées obtenues celles qui présentent l'une au moins

des propriétés d'une ARN polymérase telle que définie dans l'une quelconque des revendications 14 et 15.

29. Utilisation d'une ARN polymérase capable de transcrire une matrice d'ARN, sous la dépendance d'un promoteur, en 5 l'absence de facteur protéique auxiliaire, dans un procédé de transcription d'un brin matrice comprenant une séquence cible d'ARN, dans laquelle ladite ARN polymérase est choisie parmi la T7 ARN polymérase la SP6 ARN polymérase et les ARN polymérases telles que définies dans l'une quelconque des revendications 14 à 10 24.

30. Utilisation d'une ARN polymérase capable de transcrire une matrice d'ARN, sous la dépendance d'un promoteur, en 15 l'absence de facteur protéique auxiliaire, dans un procédé de transcription d'un brin matrice comprenant une séquence cible d'ARN, dans laquelle ledit brin matrice est constitué d'ARN au moins entre la position +5 et l'extrémité 5' de la cible.

31. Utilisation selon la revendication précédente, dans laquelle ladite ARN polymérase est une ARN polymérase sauvage de virus ou de phage.

20 32. Utilisation selon la revendication précédente, dans laquelle ladite ARN polymérase est choisie parmi la T7-, la T3- et la SP6- ARN polymérase.

Figure 1

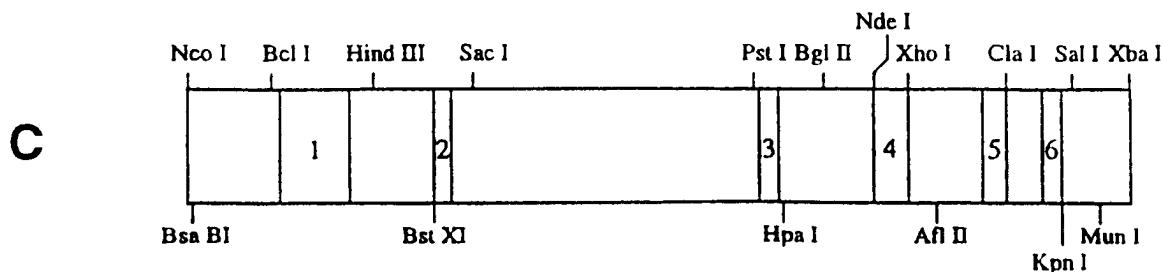
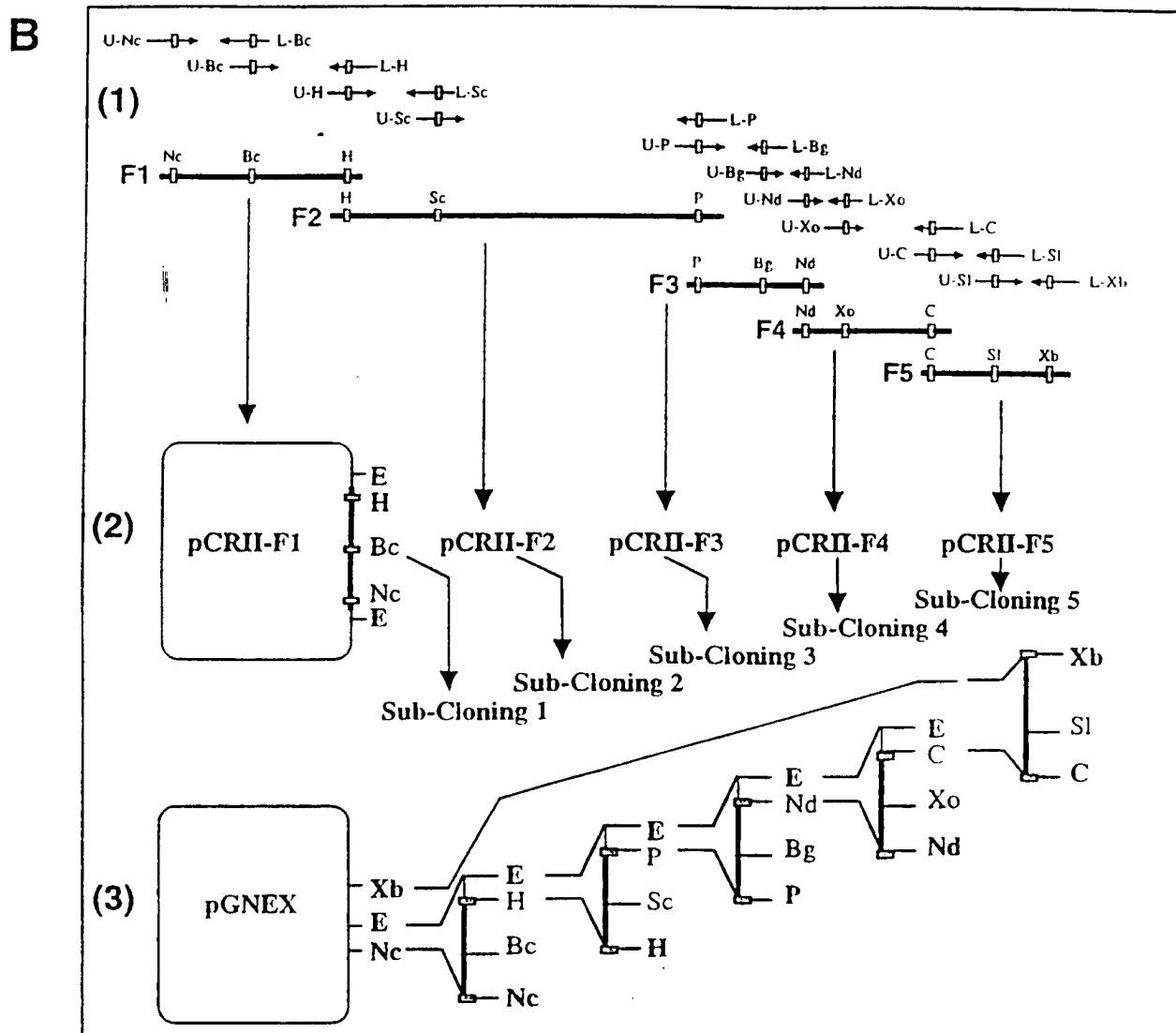
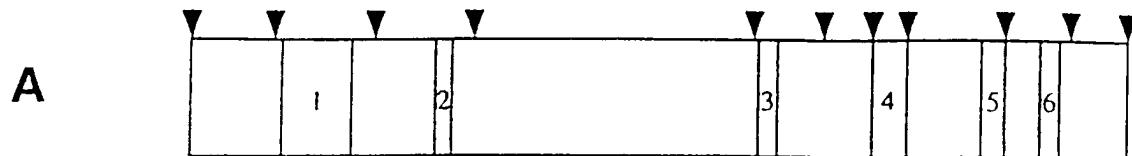


Figure 2

2/4

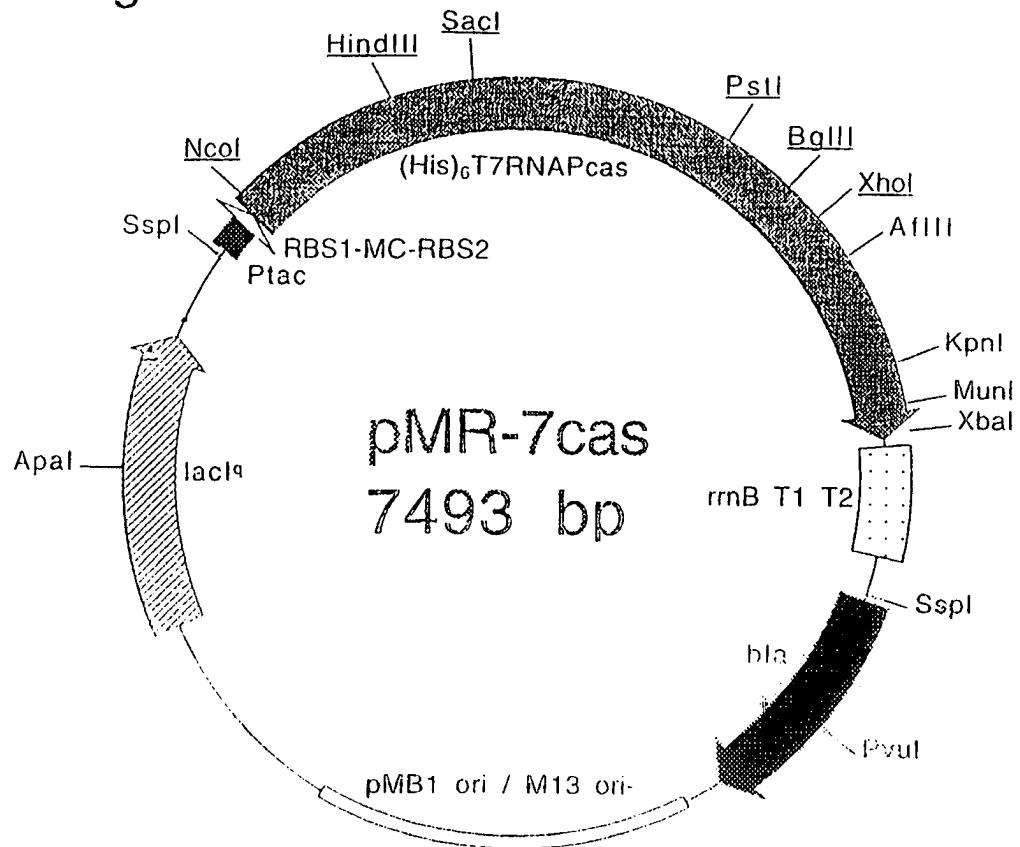


Figure 3



FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

Figure 4

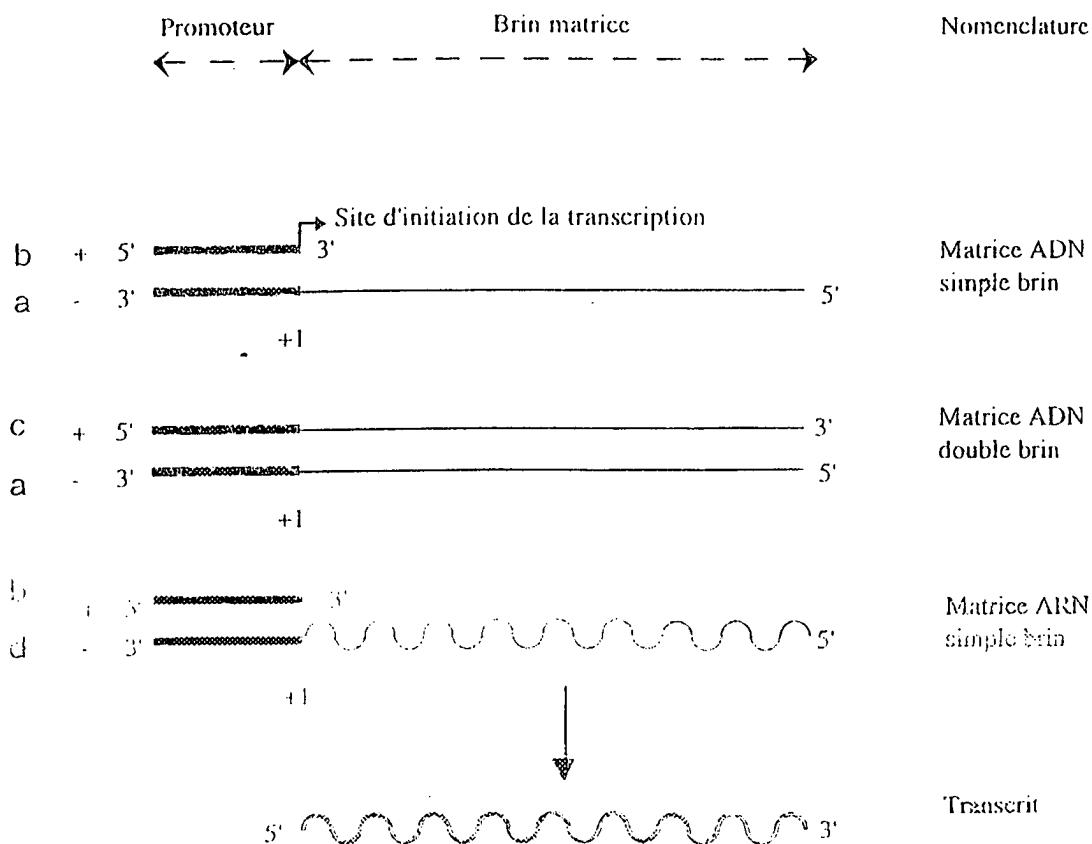


Figure 5

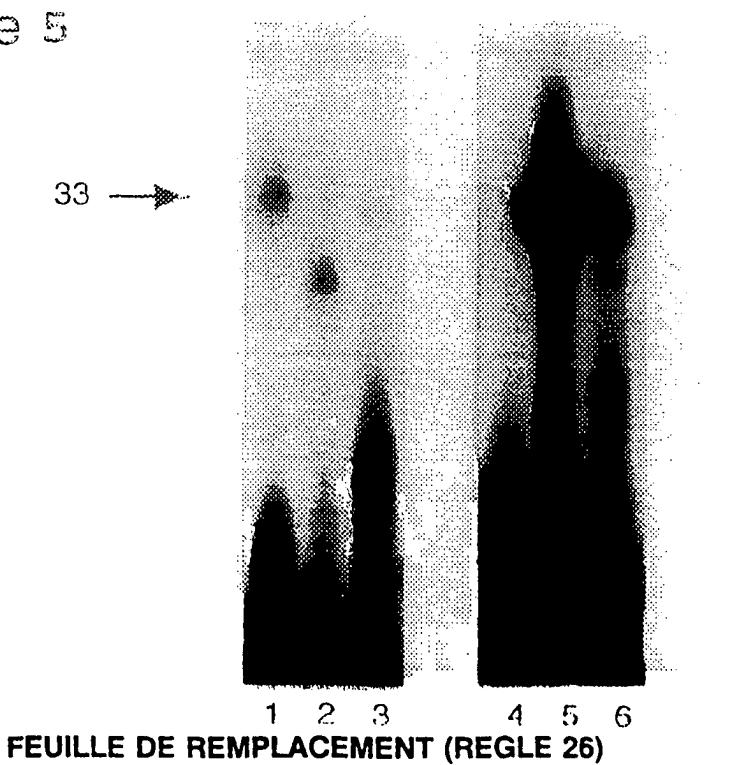
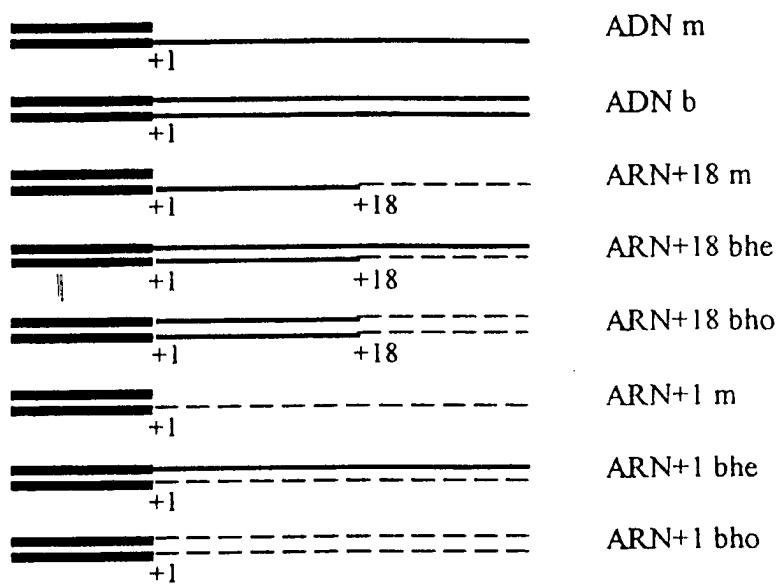


Figure 6



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 6 C12N15/54 C12N9/12 C12Q1/68

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category <sup>o</sup>	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SOUSA R ET AL: "A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL 14 (18). 1995. 4609-4621. ISSN: 0261-4189, XP002049775 see the whole document ---	14-28
Y	WO 97 12033 A (UNIV EMORY) 3 April 1997 see the whole document ---	14-28
Y	W.T. MCALLISTER: "Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)" CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY RESEARCH, vol. 39, 1993, pages 385-391, XP002049776 see the whole document ---	14-28 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

26 August 1998

07/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hix, R

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	C.A. RASKIN ET AL.: "Substitution of a single bacteriophage T3 residue in Bacteriophage T7 RNA polymerase at position 748 results in a switch in promoter specificity." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 228, no. 2, 1992, pages 506-515, XP002049777 cited in the application see the whole document	14-28
X	C. CAZENAVE ET AL.: "RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase" PROC. NATL. ACD. SCI. USA, vol. 91, July 1994, pages 6972-6976, XP002049779 cited in the application see the whole document	1-13, 29-32
A	R. SOUSA: "Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases" TIBS, vol. 21, 1996, pages 186-190, XP004050909 cited in the application see the whole document	
A	S.J. STAHL ET AL.: "Nucleotide sequence of the cloned gene for Bacteriophage T7 RNA polymerase" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 148, no. 4, 5 June 1981, pages 481-485, XP002049780 cited in the application see the whole document	
X	EP 0 747 488 A (GEN PROBE INC) 11 December 1996 see the whole document	1-13, 29-32
X	WO 95 03426 A (BIO MERIEUX ; CLEUZIAT PHILIPPE (FR); GUILLOU BONNICI FRANCOISE (FR) 2 February 1995 see the whole document	1-13, 29-32
X	WO 90 06376 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 14 June 1990 see the whole document	1-13, 29-32
X	EP 0 659 881 A (BIO MERIEUX) 28 June 1995 see the whole document	1-13, 29-32
		-/-

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>B. VAN GEMEN ET AL.: "Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification"  AIDS,  vol. 7, no. 2, November 1993, pages  s107-s110, XP002073546  see the whole document</p> <p>-----</p>	1-13, 29-32

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9712033	A 03-04-1997	AU 7200796	A	17-04-1997
		EP 0859833	A	26-08-1998
EP 0747488	A 11-12-1996	US 5710029	A	20-01-1998
		US 5705365	A	06-01-1998
		AU 5674896	A	30-12-1996
		WO 9640990	A	19-12-1996
WO 9503426	A 02-02-1995	FR 2708288	A	03-02-1995
		CA 2145533	A	02-02-1995
		EP 0662155	A	12-07-1995
		JP 8509382	T	08-10-1996
WO 9006376	A 14-06-1990	AT 137807	T	15-05-1996
		CA 2004574	A	05-06-1990
		DE 68926460	D	13-06-1996
		DE 68926460	T	12-09-1996
		EP 0446305	A	18-09-1991
		JP 4503302	T	18-06-1992
		US 5631129	A	20-05-1997
EP 0659881	A 28-06-1995	FR 2714062	A	23-06-1995
		CA 2138871	A	23-06-1995

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
 CIB 6 C12N15/54 C12N9/12 C1201/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SOUSA R ET AL: "A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL 14 (18). 1995. 4609-4621. ISSN: 0261-4189, XP002049775 voir le document en entier ----	14-28
Y	WO 97 12033 A (UNIV EMORY) 3 avril 1997 voir le document en entier ----	14-28
Y	W.T. MCALLISTER: "Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)" CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY RESEARCH, Vol. 39, 1993, pages 385-391, XP002049776 voir le document en entier ---- -/-	14-28

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et/ou appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

26 août 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07/09/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hix, R

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	C. A. RASKIN ET AL.: "Substitution of a single bacteriophage T3 residue in Bacteriophage T7 RNA polymerase at position 748 results in a switch in promoter specificity." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 228, no. 2, 1992, pages 506-515, XP002049777 cité dans la demande voir le document en entier ---	14-28
X	C. CAZENAVE ET AL.: "RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase" PROC. NATL. ACD. SCI. USA, vol. 91, juillet 1994, pages 6972-6976, XP002049779 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-13, 29-32
A	R. SOUSA: "Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases" TIBS, vol. 21, 1996, pages 186-190, XP004050909 cité dans la demande voir le document en entier ---	
A	S.J. STAHL ET AL.: "Nucleotide sequence of the cloned gene for Bacteriophage T7 RNA polymerase" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 148, no. 4, 5 juin 1981, pages 481-485, XP002049780 cité dans la demande voir le document en entier ---	
X	EP 0 747 488 A (GEN PROBE INC) 11 décembre 1996 voir le document en entier ---	1-13, 29-32
X	WO 95 03426 A (BIO MERIEUX ; CLEUZIAT PHILIPPE (FR); GUILLOU BONNICI FRANCOISE (FR) 2 février 1995 voir le document en entier ---	1-13, 29-32
X	WO 90 06376 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 14 juin 1990 voir le document en entier ---	1-13, 29-32
X	EP 0 659 881 A (BIO MERIEUX) 28 juin 1995 voir le document en entier ---	1-13, 29-32
		-/-

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>B. VAN GEMEN ET AL.: "Qualitative and quantitative detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification" AIDS, vol. 7, no. 2, novembre 1993, pages s107-s110, XP002073546 voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1-13, 29-32

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 9712033 A	03-04-1997	AU EP	7200796 A 0859833 A	17-04-1997 26-08-1998
EP 0747488 A	11-12-1996	US US AU WO	5710029 A 5705365 A 5674896 A 9640990 A	20-01-1998 06-01-1998 30-12-1996 19-12-1996
WO 9503426 A	02-02-1995	FR CA EP JP	2708288 A 2145533 A 0662155 A 8509382 T	03-02-1995 02-02-1995 12-07-1995 08-10-1996
WO 9006376 A	14-06-1990	AT CA DE DE EP JP US	137807 T 2004574 A 68926460 D 68926460 T 0446305 A 4503302 T 5631129 A	15-05-1996 05-06-1990 13-06-1996 12-09-1996 18-09-1991 18-06-1992 20-05-1997
EP 0659881 A	28-06-1995	FR CA	2714062 A 2138871 A	23-06-1995 23-06-1995